

---

# **BASI MOLECOLARI DELL'INTERAZIONE PIANTA-INSETTO**

---

**Valentina Coppola**

Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XXIV ciclo  
Indirizzo Biotecnologie Vegetali  
Università di Napoli Federico II





Dottorato in Scienze Biotecnologiche –XXIV ciclo  
Indirizzo Biotecnologie Vegetali  
Università di Napoli Federico II



---

## **BASI MOLECOLARI DELL'INTERAZIONE PIANTA-INSETTO**

---

**Valentina Coppola**

Dottoranda: Valentina Coppola

Relatore: Prof.ssa Rosa Rao

Coordinatore: Prof. Giovanni Sannia



*Alla mia famiglia*



## INDICE

<b>1. RIASSUNTO</b>	1
<b>2. SUMMARY</b>	3
<b>3. INTRODUZIONE</b>	7
3.1 Le difese della pianta agli insetti dannosi	7
3.2 Gli elicitori nell'interazione pianta-insetto	9
3.3 La percezione degli insetti da parte della pianta	10
3.3.1 L'interazione pianta-insetto fitofago	10
3.3.2 L'interazione pianta-insetto fitomizo	12
3.3.2.1 I geni di resistenza ad afidi	13
3.3.2.2 Pathway molecolari agenti in pianta dopo attacco dell'afide	15
3.4 La pianta come mediatore nelle risposte tra gli insetti del suolo e della parte aerea	18
<b>4. MATERIALI E METODI</b>	21
4.1 Allevamento delle piante e degli insetti	21
4.2 Saggi di infestazione afidica e raccolta materiale vegetale	21
4.3 Analisi microarray	22
4.3.1 Estrazione dell'RNA totale	22
4.3.2 Amplificazione e marcatura del cRNA	22
4.3.3 Ibridazione dei campioni e scansione degli array	23
4.3.4 Analisi dei dati microarray	23
4.4 Analisi di espressione tramite real-time RT-PCR	24
4.4.1 Retrotrascrizione del primo filamento di cDNA	24
4.4.2 Controllo sintesi primo filamento di cDNA	24
4.4.3 Analisi Real Time PCR quantitativa	24
4.5 Analisi proteomica	25
4.5.1 Estrazione proteica e analisi elettroforetica in due dimensioni	25
4.5.2 Acquisizione immagine e analisi	26
4.5.3 Digestione proteica e analisi MALDI TOF	26
4.5.4 Identificazione delle proteine	27
4.6 Saggio di performance dell'afide	27
4.7 Saggi biologici all'olfattometro con <i>Diaeretiella rapae</i>	28
4.8 Risposta molecolare della pianta di pomodoro al duplice attacco	29
<b>5. RISULTATI</b>	30
5.1 Identificazione dei geni attivati in seguito all'attacco dell'afide <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	30

5.2 Identificazione delle classi funzionali	33
5.3 Classificazione funzionale dei geni differenzialmente espressi	35
5.3.1 Geni correlati alle risposte di difesa	35
5.3.2 Geni correlati alla trasduzione del segnale	37
5.3.3 Geni correlati alla regolazione trascrizionale	38
5.3.4 Geni correlati alla modificazione della parete cellulare	39
5.3.5 Geni correlati alla fotosintesi e al metabolismo primario della pianta	40
5.3.6 Geni correlati al metabolismo secondario della pianta	41
5.3.7 Geni correlati all'organizzazione cellulare	42
5.3.8 Geni correlati al trasporto	43
5.4 Validazione mediante Real-time PCR dei geni selezionati dall'analisi trascrittomica	43
5.5 Identificazione delle proteine prodotte in seguito all'attacco dell'afide <i>Macrosiphum euphorbiae</i> .	45
5.6 Confronto tra lo studio microarray e l'analisi proteomica di piante di pomodoro infestate con l'afide <i>M. euphorbiae</i>	50
5.7 La performance dell'afide <i>Myzus persicae</i> è influenzata dall'insetto terricolo <i>Agriotes lineatus</i>	51
5.8 Saggio di preferenza del parassitoide <i>Diaeretiella rapae</i>	52
5.9 Analisi di espressione dei geni di difesa in pianta di pomodoro sottoposte al duplice attacco	53
<b>6. DISCUSSIONI</b>	56
6.1 L'attacco dell'afide <i>M. euphorbiae</i> provoca un'ampia riprogrammazione trascrizionale in pomodoro	56
6.1.1 Il ruolo delle specie reattive dell'ossigeno e del calcio come molecole segnale nell'attivazione delle risposte di difesa in pomodoro	57
6.1.2 L'attacco di <i>M. euphorbiae</i> attiva in pomodoro pathway associati all'acido salicilico ed etilene	59
6.1.3 La duplice regolazione dei geni associati alla modificazione della parete cellulare	62
6.1.4 L'afide <i>M. euphorbiae</i> altera il metabolismo primario e secondario della pianta di pomodoro	64
6.2 Un modello della risposta del pomodoro a <i>M. euphorbiae</i>	68
6.3 La pianta di pomodoro come mediatore nell'interazione tra l'afide <i>M. persicae</i> e l'insetto terricolo <i>A. lineatus</i>	69
<b>7. CONCLUSIONI</b>	73
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	75
<b>APPENDICE</b>	94



# 1. RIASSUNTO

Gli insetti succhiatori, tra cui gli afidi, sono tra le principali cause di danno alle colture agricole in quanto sottraggono ingenti quantità di linfa elaborata e fotosintetizzata alla pianta attaccata, manipolando in modo significativo la sua fisiologia. Diversamente dagli insetti erbivori, la prolungata interazione che gli afidi stabiliscono con i tessuti della pianta minimizza i danni meccanici, con conseguente attivazione di processi di difesa diversi da altri insetti masticatori. L'afide della patata (*Macrosiphum euphorbiae* T.) è uno dei parassiti più dannosi del pomodoro coltivato (*Solanum lycopersicum*), a cui causa danni diretti, come foglie deformi e avvizzimento, oltre a danni indiretti quale la trasmissione di virus patogeni. In pomodoro, i cambiamenti trascrizionali in risposta all'attacco dell'afide ed i meccanismi molecolari associati allo sviluppo del danno sono ancora largamente inesplorati. Per investigare quali siano le risposte attivate in seguito all'attacco dell'afide, è stata condotta un'analisi trascrittomica e proteomica nella varietà di pomodoro 'Microtom'. Per monitorare i cambiamenti nell'espressione genica è stata effettuata un'analisi trascrizionale a 24h, 48h e 96h dall'attacco di *M. euphorbiae*. Tale studio ha mostrato che il numero di geni coinvolti nella risposta della pianta all'attacco dell'afide raggiunge il suo massimo a 48h, implicando l'attivazione di una risposta dinamica e crescente della pianta nelle prime fasi di attacco per poi assistere ad una attenuazione della risposta nell'ultimo time-point. Nelle prime 24h, la pianta attiva anche diversi geni che codificano per recettori di membrana con attività chinasi, che si pensa giochino un ruolo centrale nella trasduzione del segnale extracellulare. In seguito alla percezione dell'afide, geni coinvolti nella produzione di molecole segnale associate agli stress ossidativi e agli incrementi di calcio citosolico, così come diversi fattori di trascrizione WRKY, sono upregolati dopo 48h nelle piante infestate. In pomodoro, nei tre tempi di infestazione, è stata osservata l'induzione di geni dipendenti dall'acido salicilico e correlati alla patogenesi (PR), mentre differenti geni correlati al "wounding" e all'acido jasmonico sono risultati up e down regolati, mostrando come la risposta della pianta sia effettivamente diversa da quella degli insetti masticatori. Inoltre, l'attacco dell'afide causa cambiamenti dell'espressione di geni coinvolti nella modificazione della parete cellulare, nel metabolismo primario e secondario e nella fotosintesi. Per meglio illustrare i cambiamenti in pomodoro a seguito dell'attacco afidico, è stata eseguita anche un'analisi proteomica. Questa, condotta dopo 48h, ha individuato 87 spot differenzialmente espressi, 49 dei quali rappresentati da una singola proteina. La maggior parte delle proteine identificate è coinvolta nel processo fotosintetico, nella risposta agli stress ossidativi, mentre altre nelle risposte di difesa. Questi studi hanno mostrato come la risposta molecolare della pianta di pomodoro all'attacco afidico è complessa e multifattoriale e rappresenta un importante contributo per la successiva comprensione di specifici meccanismi di resistenza del pomodoro agli afidi.

In natura così come in campo, le piante raramente sono attaccate da una singola specie erbivora, ma devono far fronte alla sfida lanciata da diversi insetti dannosi. Diverse specie di insetti possono attaccare la pianta contemporaneamente o in modo sequenziale, andando ad influenzare, in primo luogo, le difese primarie della pianta ospite e indirettamente la capacità di crescita, di sviluppo e di sopravvivenza di l'uno l'altro insetto anche quando attaccano differenti porzioni della pianta ospite.

Per valutare un possibile effetto sulla performance dell'afide *M. persicae*, quando condivide la pianta ospite con l'insetto terricolo *A. lineatus*, il tempo di sviluppo, la fertilità e la crescita dell'afide sono stati valutati. Lo studio ha evidenziato che la

presenza dell'insetto terricolo influisce negativamente sulla performance dell'afide. Inoltre, è stata valutata l'influenza dell'insetto terricolo anche sul terzo livello trofico, rappresentato dal nemico naturale *Diaeretiella rapae*, mediante uno studio comportamentale del parassitoide. La scelta del parassitoide *D. rapae* non è significativamente influenzata da *A. lineatus* quando il suo ospite, *M. persicae*, è presente su piante di pomodoro. Un simile risultato, è stato osservato per piante infestate solo dall'insetto terricolo verso piante prive di infestazione. Per analizzare le risposte di difesa indotte in seguito al danno provocato dall'azione individuale o combinata degli insetti del suolo e della parte aerea, è stata condotta un'analisi di espressione 24h, 48h e 8 giorni dall'infestazione di geni scelti sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi trascrittomica, di cui è noto un loro coinvolgimento nella risposta della pianta agli stress biotici. L'analisi di espressione ha evidenziato che, a livello distale, l'afide determina l'espressione di geni correlati al pathway dell'acido salicilico, quali *Nimin2c* e *PR1*, con un maggiore livello di espressione nel primo tempo di infestazione. Un differente profilo di espressione si osserva dopo attacco dell'insetto terricolo *A. lineatus*. Infatti, fin dalle prime fasi i livelli di espressione dei geni oggetto di studio aumentano significativamente e con il progredire della risposta restano indotti implicando l'attivazione di una risposta di difesa nelle foglie mediante la regolazione sistemica delle molecole segnale. In generale, in risposta al danno provocato sia a livello radicale che fogliare, i geni analizzati mostrano un profilo di espressione paragonabile al singolo attacco da parte di *A. lineatus*, suggerendo che il danno radicale causato dall'insetto terricolo è in grado di influenzare le risposte della pianta di pomodoro, mediante l'induzione sistemica di pathway coinvolti nelle risposte di difesa della pianta contro l'afide.

## 2. SUMMARY

Phloem-feeding insects, such as aphids, are major agricultural pests, damaging crops by removing photoassimilates and vectoring numerous devastating plant viruses. Aphids have a unique feeding strategy and impose a distinctive stress on plants. Most aphids feed on contents of vascular tissues by inserting a stylet between conductive cells, causing a limited cell damage, and thus limiting the induction of a wound response. Furthermore, aphids establish a prolonged with the attacked plant tissue. Consequently, plant responses to phloem-feeding aphids are distinct from those of chewing insects.

The molecular basis of plant–aphid interaction remains poorly understood, despite aphids are the largest group of phloem-feeding insects. However, some studies suggested that these insects may trigger plant responses that overlap with wounding and fungal pathogens. In recent years, changes in gene expression induced by aphid attack have been studied in a number of plant/aphid interactions by using transcriptional profiling. Different studies highlighted that molecular responses to hemipteran pests are complex. Changes in levels of RNAs encoding proteins involved with defense, ROS generation or scavenging, cell wall fortification, synthesis of secondary metabolites, as well as primary metabolism are often observed.

The potato aphid *Macrosiphum euphorbiae* is one of the most damaging pests of cultivated tomato (*Solanum lycopersicum*) worldwide causing leaf curling, chlorosis and necrosis of leaves, resulting in defoliation and yield losses when pest population is high. Besides the direct feeding damage, potato aphid can transmit several viruses to tomato. Tomato transcriptional changes in response to aphids and molecular mechanisms associated with the development of symptoms are currently largely unexplored. To investigate tomato responses activated during a compatible interaction, transcriptomic and proteomic analysis were carried out to monitor changes in host gene expression during *M. euphorbiae* attack.

A time series-based investigation of the tomato cv ‘Microtom’ after *M. euphorbiae* infestation was carried out using controlled infestations. Leaf tissues were collected 24h, 48h and 96h after infestation to monitor the progress of induced response. Equal amounts of labelled cRNAs from control and infested plants were mixed together and hybridized to Agilent tomato array (4X44k) representing about 22000 tomato transcripts. The slides were scanned and the raw data were read out by Agilent Feature Extraction software (Agilent) and processed by GeneSpring 10 (Agilent). Microarray data were normalized using intensity-dependent global normalization (LOWESS). Differentially expressed RNAs were identified by using the Benjamini and Hochberg False Discovery Rate (p-Value < 0,05) to minimize selection of false positives. Of the significantly differentially expressed RNA, only those with greater than 2-fold increase or 2-fold decrease in expression (compared to the uninfested controls) were used for further analysis. The analysis showed that about 2.3% of the genes presented on the array had an altered expression profile. The investigation of the overall transcriptome highlighted a dynamic response of the plant to aphid attack, with extensive gene expression changes after 48h. Specifically, 24 hours after infestation, 182 genes (87 up and 95 down), were significantly induced or repressed. The number of deregulated genes is more relevant to 48h (768-391 genes up and 377 down), while at 96 h, 49 genes (23 up and 26 down) were differential expressed. To understand the biological processes and the molecular function in which the differentially expressed genes were involved we used the Blast2GO tool, which assigned GO annotation to a gene based on sequence

similarity to other gene sequences in preselected database. Genes were grouped into different categories according to their functional classification. This analysis showed that transcriptional reconfiguration covered a broad range of biological processes and main differences were in the levels of transcripts concerning stress and plant defence, signaling and transcription. Following aphid feeding, tomato triggered the up-regulation of several genes encoding receptor putatively involved in early signaling perception. Genes coding for calcium-binding proteins and proteins related to the synthesis of ROS were up regulated indicating that these signals can be involved in the early step of aphid response signal transduction. Infested tomato plants also overexpressed genes coding for antioxidant enzymes, suggesting that plants try to defend themselves from the possible damage resulting from high levels of reactive molecules. During the three times of infestation, genes involved in SA-signaling pathway and stress-responsive SA-dependent genes were upregulated, as well as genes associated with ET-signalling. The wound-inducible JA synthesis pathway was less responsive. Different genes coding key enzymes of JA synthesis were down regulated. However, some JA-dependent anti-insect proteins were differentially expressed, showing that tomato defence mechanisms involve a multi-component defense response. On the other hand, a general downregulation of gene correlated with photosynthesis and carbon assimilation was observed. This supports the hypothesis that induction of effective defense response requires repression of other cellular functions to ensure metabolic balance. In addition the downregulation of genes involved in primary metabolism, could represent a resource allocation shift from growth to defence, to develop and support a more effective response against aphids.

To study the proteome changes of tomato plants, we compared the leaf protein profile of uninfested tomato plants with that of plant 48h following *M. euphorbiae* attack. The analysis revealed that the number of differentially expressed spots were 87, showing qualitative and quantitative differences between infested and uninfested controls plants. Spot differences were only considered if they were consistently present in all replicates and statistically significant (Student's t-test;  $p < 0.05$ ). All differentially expressed protein spots were analyzed by peptide mass fingerprinting (PMF) using MALDI-TOF mass spectrometry. The results indicated that 49 spots out of 87 represented a single protein. To understand the biological processes and the molecular function in which the differentially expressed genes were involved we also used the Blast2GO tool. The identified proteins mainly belong to three functional categories: photosynthesis and carbohydrate catabolism, stress and defense responses and protein synthesis and degradation. The putative role of the identified proteins supports the hypothesis of i) an increased oxidative burst/stress in tomato, which reacts by activating protein involved in the detoxification of oxygen radicals; ii) a reduced investment in photosynthetic proteins following herbivory attack, which is necessary to support the induction of a defense response. Besides, the identified proteins that play a key role in protein translation, protein complex assembly, proteolysis and folding were down regulated in infested plants, reflecting a general stress condition.

Plants may be exposed to the simultaneous attack by both below- and above-ground pests. This dual attack can cause systemic changes that affect the whole plant defense. For instance, the attack of below-ground pests can affect above-ground organism fitness and *viceversa*. Until the end of the last century most of the work was focused on the response induced by only one species of attacker and there had been a sort of separation between research on belowground and aboveground

interactions. Currently, it is increasingly clear that herbivorous insects can interact also when they are temporally or spatially separated from the other herbivores, when sharing the same host plant. To investigate a possible effect of belowground insect on the performance of aboveground phloem-feeding aphids, we reared one-day-old nymphs of *M. persicae* on leaves of plants previously exposed for eight days (treatment) and not exposed (control) to the root-herbivore *A. lineatus* larvae. Growth, development and fecundity of *M. persicae* were recorded. The development time of aphids feeding on the shared host plants was extended by 2.5 days. The number of offspring produced by *M. persicae* on root-damaged plants was significantly lower than control plants, as well as weight of aphids grown on damaged plants. We also compared the root and shoot biomass in plants with and without root damage and *A. lineatus* decreased root, but not shoot biomass. The presence of belowground insects can also affect higher trophic levels, such as the natural enemies of root and shoot herbivores in the food web. We tested if the behavior of aphid parasitoid *Diaeretiella rapae* was affected by the presence of root herbivore. The experiment was performed using a Y-tube set-up and making the following choice-test comparisons: i) plants with *M. persicae* vs plants with *M. persicae* and roots damaged by *A. lineatus*; ii) undamaged plants vs plants with roots damaged by *Agriotes*. Plant preference of the parasitoid *D. rapae* was not significantly affected by root herbivores, when its host *M. persicae* was present on the leaves of both root-damaged and root-undamaged plants. A similar response was obtained also for the other treatment, indicating that the parasitoid did not avoid tomato plants that had solely been exposed to damage of the root herbivores. Finally, we investigated the transcriptional changes induced in tomato when plants are individually or at same time attacked by below- and aboveground insects. This study was performed at different time of infestation (24h, 48h and 8 days). We monitored the expression level of genes, chosen selected between the differentially expressed genes of microarray study and representative of the main defence pathways in tomato. The study showed that aphids have a limited impact on gene expression, while root attack by *A. lineatus* can induce the expression of defense-related genes in leaves, indicating the involvement of a long-distance defense signals. The expression in dual-damaged plants show a profile more similar to the root herbivore attack. Aphids contribute in limited way to the systemic activation of defense, except for gene associated to SA and JA pathways that showed higher level of expression.

In conclusion, the present study provides the first transcriptomic and proteomic responses of tomato plants to aphid attack. Up to date little is known about the molecular aspects of the defense responses of tomato plants to phloem feeding insects. Our data provide an overview of molecular pathways activated during *S. lycopersicum*-*M. euphorbiae* interaction and demonstrate an extensive reprogramming of transcription in plants following aphid attack. In order to fully understand the role of specific genes in the tomato defence response, future functional studies of tomato genes could be used. Moreover, the identification of genes that could be involved in the response of tomato, provides a baseline against which to screen other tomato genotypes for the presence and specific up-regulation of these genes and, thus, may provide useful markers for tolerance. In a broader perspective, these improved understandings at the molecular and cellular levels of aphid defence response in tomato could benefit other economically important Solanaceae crops.

For instance, the molecular understanding of the tomato response was a useful starting point to shed light on the complex interplay between tomato and different

pests. The data indicated that the root herbivore *A. lineatus* reduces the performance of the above-ground pest *M. persicae*. Two theories were postulated to explain the above and belowground herbivory interaction: the 'stress response hypothesis' that predicts a modifications of plant chemistry due to root-herbivore-induced drought stress, which implied an augmentation of nutrients in the shoot and, thus, enhancing of performance of shoot herbivores; the 'defense induction hypothesis' suggested that the effect of root herbivore damage on the performance of aboveground insect may be associated with systemic induction of defense compounds in the shoot, which in turn can reduce the performance of the foliar feeders. Both these mechanism appears not be mutually exclusive. The transcriptional analysis revealed that *A. lineatus* is able to alters the tomato's aboveground defence status, systemically inducing pathways involved in plant response to *M. persicae*, thus supporting 'defense induction hypothesis' for this duple interaction.

### 3.INTRODUZIONE

#### 3.1 Le difese della pianta agli insetti dannosi

Il controllo degli insetti dannosi costa miliardi di dollari in termini di perdite di raccolto e uso d'insetticidi (Gordon e Waterhouse, 2007). Inoltre, i coltivatori sono posti continuamente di fronte alla costante minaccia che gli insetti dannosi possano sviluppare gradi crescenti di resistenza ai più comuni insetticidi. Tale fenomeno è accentuato dal fatto che gli insetticidi di sintesi sono usati in quantità sempre più massiccia (Gordon e Waterhouse, 2007). È sempre più chiara la necessità di sviluppare delle strategie alternative per la protezione delle colture agricole in modo da poter ridurre l'uso d'insetticidi chimici. Il perseguimento di tale obiettivo ha incrementato l'interesse verso l'identificazione di nuovi geni e molecole, e nuove strategie in grado di esercitare un'azione di contenimento degli insetti dannosi, tramite ad esempio lo studio dei meccanismi endogeni di difesa della pianta.

Le piante e gli insetti erbivori coesistono insieme da più di 350 milioni di anni e costituiscono circa la metà della biodiversità esistente sulla terra (Gatehouse, 2002). Gli insetti hanno sviluppato nel corso del tempo una serie d'interazioni che sono tra le più dominanti e intricate dell'ecosistema terrestre e sono in grado influenzare gli organismi ad ogni livello (Strong et al., 1984). Sebbene alcune delle interazioni che si stabiliscono tra le piante e gli insetti erbivori (ad esempio l'impollinazione) siano reciprocamente benefiche, le interazioni più comuni sono di tipo antagonistico. Infatti, a secondo dell'intensità dell'attacco, gli insetti erbivori possono essere estremamente dannosi per le piante causandone anche la morte (Strong et al., 1984). Quando una pianta percepisce la presenza di un insetto erbivoro, identifica lo stimolo proveniente dall'esterno e mette in atto delle risposte di difesa flessibili e dinamiche (Karban e Baldwin, 1997).

Nonostante la vulnerabilità delle piante a diverse condizioni avverse di tipo biotico e abiotico in quanto organismi sessili, gli organismi vegetali sono in grado di persistere in un ambiente molto variabile e sfavorevole grazie ad un sistema di difesa che si basa sulla combinazione di caratteristiche fisiche e chimiche (Schoonhoven et al., 2005). Le piante per proteggersi dall'attacco degli insetti dannosi usano innumerevoli meccanismi di difesa che, possono essere classificati sia sulla base del tempo di azione, come costitutive e indotte, e in base alla modalità di azione, come dirette e indirette. Si definisce costitutiva quella risposta di difesa sempre presente nella pianta che si manifesta tramite la presenza di barriere fisiche (ad esempio: pareti lignificate, resine, ispessimenti di callosio, suberine, etc), e la produzione di composti con azione deterrente, anti-deponente e tossica (Harborne, 1998; Bennet e Wallsgrove, 1994). In contrasto, le risposte di difesa indotte sono messe in atto solo quando la pianta è fisicamente attaccata dall'insetto. Alla luce delle richieste di energia e di nutrienti necessari per la biosintesi dei composti di difesa, non sorprende che le piante utilizzino sofisticati sistemi di regolazione per bilanciare la crescita e la difesa. Per tanto, le difese inducibili sono in grado di diminuire le prestazioni dell'insetto fitofago (Wu e Baldwin, 2010). Le difese inducibili possono essere classificate in due gruppi: difesa diretta e difesa indiretta. Le difese dirette sono in grado di interferire direttamente con il comportamento alimentare, la crescita, lo sviluppo e la riproduzione dei fitofagi mediante adattamenti di natura fisica e chimica. Gli adattamenti fisici coinvolgono solitamente la superficie della pianta, come spine, tricomi, peli ghiandolari, cere etc. che possono prevenire il contatto dell'insetto con la superficie fogliare, limitarne il movimento o precludere l'accesso alle risorse nutritive

(Tremblay, 2003). Ad esempio i peli ghiandolari sono in grado di produrre sostanze che possono repellere l'insetto erbivoro o dissuaderlo dal nutrirsi. Rappresenta una difesa diretta anche la produzione di metaboliti secondari (fenilpropanoidi, terpenoidi, alcaloidi, acidi grassi etc.) che sono capaci di agire come deterrenti alimentari, tossine, repellenti o veleni. Infine, le difese dirette si possono manifestare mediante la produzione di proteine di difesa che agiscono in seguito ad ingestione da parte dell'insetto. Tali sostanze possono essere direttamente tossiche per l'insetto o esercitare la loro azione riducendo il valore nutrizionale della pianta (Zhu-Salzaman et al., 2008). In quest'ultima categoria rientrano gli inibitori di proteasi (IP), proteine antidiigestive, classificate in base alle proteasi che sono in grado di inibire. Tali proteine sono normalmente presenti ad alte concentrazioni negli organi di riserva della pianta, quali semi e tuberi, e a livelli più bassi nei tessuti fogliari, in cui però sono attivamente indotte in seguito a ferita o attacco di erbivori (Rakwal et al., 2001). Gli IP influenzano la performance dell'insetto fitofago mediante inibizione degli enzimi digestivi presenti nell'intestino, con conseguente carenza di aminoacidi essenziali per lo sviluppo dell'insetto, grazie alla formazione di complessi stabili con i siti catalitici delle proteasi e conseguente inibizione (Tamayo et al., 2000; Koiwa et al., 1997). Gli IP costituiscono solo una parte dei meccanismi di difesa, in quanto sono state identificate altre proteine anti-nutrizionali capaci di degradare gli aminoacidi. Ad esempio, in pomodoro, gli enzimi treonina deaminasi 2 (TD2) e arginasi alterano la digestione dell'insetto mediante la degradazione di aminoacidi indispensabili alla sopravvivenza dell'insetto (Chen et al., 2005). Un ulteriore gruppo di enzimi di piante che possono alterare la nutrizione degli insetti sono le ossidasi (ad esempio le polifenolo ossidasi) le quali riducono il valore nutrizionale della pianta mediante la formazione di composti altamente reattivi in grado di reagire con i gruppi sulfidrilici delle proteine riducendone l'appetibilità per l'insetto (Kessler e Baldwin, 2002). Tali enzimi sono diffusi nelle piante e sono indotti da ferita, insetti erbivori e acido giasmonico (Constabel et al., 2000; Thaler et al., 2001). Un ulteriore esempio di proteine di difesa che agiscono a livello del sistema digerente dell'insetto sono le lectine. Le lectine sono un importante gruppo di proteine che possono avere un'attività insetticida poiché sono in grado di formare dei legami con la componente chitinasica della matrice peritrofica dell'insetto alterandone la sua morfologia (Zhu-Salzman et al., 1998).

Le piante, inoltre, possono mettere in atto dei meccanismi di difesa indiretta, ovvero gli organismi vegetali sono in grado di interferire indirettamente con le popolazioni di fitofagi, esaltando l'azione dei loro nemici naturali (predatori e parassitoidi). Infatti, in seguito all'attacco dell'insetto dannoso, la pianta è in grado di instaurare col nemico naturale un rapporto mutualistico, sia fornendo rifugio e nutrimento (ad es. nettare extrafioreale) (Wackers et al., 2001) sia, soprattutto, producendo composti chimici volatili (semiochimici) che facilitano l'individuazione della pianta attaccata dall'insetto-preda (Van Poecke e Dicke, 2004). Ciò consente di sostenere la presenza del nemico naturale e di conseguenza ridurre la popolazione dell'insetto dannoso (Bruinsma e Dicke, 2008).

Uno dei primi esempi descritti in letteratura è stato descritto in piante di *Phaseolus lunatus* infestate dall'acaro *Tetranychus urticae*, producevano un ampio range di composti volatili, tra cui terpenoidi e metilsalicilato, in grado di attrarre il predatore *Phytoseiulus persimilis*, facilitando in tal modo l'individuazione della preda (Dicke et al., 1999). Inoltre, sempre in fagiolo fu poi osservata la produzione di nettare extrafioreale con conseguente incremento del numero di visite da parte d'insetti predatori quali formiche e vespe (Kost e Heil, 2005). L'emissione dei composti



organici volatili (VOC) ha luogo sia localmente sia sistematicamente e può durare per ore o continuare per giorni. Tra le classi di composti volatili rilasciati dalla pianta in seguito ad attacco da insetti, ci sono i terpenoidi tra cui monoterpeni (C10) sesquiterpeni (C15) e omoterpeni (C11 o C16) (Degenhardt et al. 2003), i composti C6 quali aldeidi, alcoli e esteri, denominati “green leaf volatiles”, che sono rilasciati immediatamente dopo danno da ferita. Il blend di volatili emessi da una pianta danneggiata è una miscela complessa, spesso costituita da più di cento composti differenti, molti dei quali presenti in piccole quantità (Dicke, 1997). Specie di piante differenti possono variare nella composizione delle miscele emesse, così come dividerne altri, ma a volte anche all’interno della stessa specie, il blend di volatili emesso dopo danno da insetto erbivoro può variare qualitativamente e quantitativamente. Sono diversi i fattori che influenzano il tipo di volatile prodotto, quali ad esempio il genotipo/cultivar della pianta, lo stato di sviluppo, il tipo di tessuto danneggiato e l’intensità del danno così come le condizioni di crescita della pianta (Dicke et al., 2009). Tale specificità può essere sfruttata dal nemico naturale per localizzare il suo ospite o anche un particolare stadio di sviluppo della sua preda (Turlings e Benrey, 1998). I VOC, oltre ad agire principalmente nelle risposte di difesa indiretta, possono ricoprire un ruolo anche nei meccanismi di difesa diretta, poiché possono esercitare un effetto tossico o repellente durante l’ovideposizione degli insetti dannosi (De Moraes et al., 2001).

### 3.2 Gli elicitori nell’interazione pianta-insetto

La pianta per attivare le risposte ad uno stress biotico deve essere in grado di percepire la presenza dell’insetto dannoso, dando così il via all’attivazione di una cascata di eventi che portano alla biosintesi di metaboliti che co-operano nello sviluppo della difesa. I cambiamenti biochimici, fisiologici e molecolari che si verificano in risposta al danno provocato da un invasore sono dettati dal meccanismo di alimentazione, dalla quantità di tessuto danneggiato e dagli elicitori chimici ed effettori che sono forniti o generati nella pianta dall’aggressore (Walling, 2009). Le conoscenze che sono a disposizione circa gli elicitori prodotti dagli insetti erbivori e che sono in grado di attivare risposte di difesa sono ancora oggi molto limitate. Essi possono essere prodotti dall’insetto e rilasciati direttamente nel sito di alimentazione, ma ci sono esempi di elicitori prodotti dalla pianta che sono modificati dagli enzimi dell’insetto prima di essere iniettati nella pianta. A oggi i FACs (fatty acid-amino acid conjugates) sono tra i composti maggiormente studiati e caratterizzati. Un esempio è la volicitina, isolata e purificata nelle secrezioni orali di *Spodoptera exigua* (Turlings et al., 1993), che applicata a piante di *Zea mays* feriti induce la produzione dello stesso blend di volatili rilasciato in seguito all’attacco di *Spodoptera exigua* (Alborn et al. 1997). Molecole appartenenti alla classe dei FACs sono state identificate anche nelle secrezioni orali di *Manduca sexta*, *Teleogryllus taiwanemma* e *Drosophila melanogaster* (Halitschke et al., 2001, Yoshinaga et al., 2007) suggerendo che i FACs svolgono un importante ruolo fisiologico nell’insetto. Sono state identificate anche altre molecole capaci di agire come elicitori delle risposte di difesa quali ad esempio l’incepitina derivante dalla degradazione della subunità  $\gamma$  del enzima ATP sintasi a livello del tratto intestinale di *Spodoptera frugiperda* (Schmelz et al., 2007) e la caelifarina, recentemente identificata in *Schistocerca americana* (Alborn., 2007). Ulteriore esempio di molecola di origine peptidica che agisce da elicitore delle risposte di difesa è la  $\beta$ -glucosidasi, infatti, quando applicata a piante di fagiolo o cavolo stimola il rilascio di un blend di volatili simile a quello emesso in seguito ad

attacco di *Tetranychus urticae* e *Pieris brassicae* (Mattiacci et al., 1995). Sono stati identificati anche altri esempi di secrezioni prodotte dall'insetto, quali ad esempio i fluidi di ovideposizione, in grado elicitarle le risposte di difesa. Esistono diverse prove che dimostrano che la deposizione delle uova sulla superficie delle foglie e le secrezioni rilasciate dagli ovidotti stimolano il rilascio di volatili, una diminuzione della produzione di etanolo e l'induzione di geni importanti nella biosintesi dei terpenoidi (Köpke et al., 2008; Schröder et al., 2007). Molti di questi studi sono stati condotti su insetti masticatori. Solo recentemente, Bos et al., (2011) hanno identificato nella saliva dell'afide *M. persicae* una proteina, Mp10, in grado di innescare in *N. benthamiana* una risposta di difesa, mediante lo sviluppo di aree clorotiche e necrotiche sulle foglie. Inoltre, quando espressa in modo transiente, la proteina Mp10 riduceva la performance dell'afide, quando fatti crescere su foglie trasformate. Tale proteina mostra delle caratteristiche funzionali con le molecole effettrici prodotte dagli agenti patogeni, in grado di attivare nelle piante di tabacco una proteina di resistenza con un dominio NBS-LRR (nucleotide-binding site leucine-rich repeat), suggerendo un possibile ruolo, come molecola effettrice dell'afide, nel determinare l'attivazione di una risposta di difesa in pianta conseguente l'attacco (Bos et al., 2011). La possibilità che le risposte della pianta agli afidi sono anche modulate da un meccanismo del tipo "gene per gene" (Van der Biezen e Jones, 1998) apre interessanti prospettive per il controllo degli insetti fitomizi.

Data la diversa natura degli elicitori prodotti dagli insetti erbivori, gli eventi molecolari che ne scaturiscono possono essere qualitativamente e quantitativamente differenti. Infatti, essi possono determinare l'attivazione di certi pathway molecolari ma sopprimerne altri. Pertanto, il segnale che ne deriva dalla percezione di uno specifico elicitore/effettore da parte della pianta, viene gradualmente amplificato e tradotto in una specifica combinazione di proteine, molecole e metaboliti secondari con azione di difesa (Wu e Baldwin, 2010).

### **3.3 La percezione degli insetti da parte della pianta**

#### **3.3.1 L'interazione pianta-insetto fitofago**

Gli insetti erbivori sono in grado di utilizzare un ampio range di meccanismi per recuperare nutrienti dalla pianta e sulla base della loro modalità di alimentazione e il loro stile di vita è possibile distinguere gli insetti masticatori, che utilizzano delle mandibole specializzate per macerare i tessuti vegetali, dagli insetti succhiatori che utilizzano un apparato boccale di tipo pungente succhiatore per stabilire un sito di alimentazione all'interno, ad esempio, dei fasci del floema.

Diversi studi indicano che il danno provocato dall'alimentazione dell'insetto fitofago, causa una profonda riprogrammazione dell'espressione genica e del metabolismo della pianta (De Vos et al., 2005; Vogel et al., 2007). Data l'elevata intensità di danno provocato a livello del tessuto fogliare in seguito all'alimentazione non sorprende che i cambiamenti provocati dagli insetti masticatori, siano paragonabili a quelli indotti dai danni meccanici, quali ad esempio ferite e lacerazioni dei tessuti. È comunemente accettato che nell'interazione pianta-insetto erbivoro, l'acido jasmonico (JA) è il più importante ormone vegetale. Il suo ruolo chiave è stato dimostrato mediante una serie di studi su piante in cui le risposte di difesa contro gli insetti erbivori erano fortemente ridotte in seguito ad alterazione dei meccanismi di percezione o biosintesi dell'acido jasmonico (Kessler e Baldwin, 2002; Halitschke e Baldwin, 2003; Paschold et al., 2007). Oltre a ciò, diversi studi microarray hanno evidenziato un ruolo centrale di questo ormone nel regolare le risposte sia a danno meccanico che a

ferita provocata da insetto (Reymond et al., 2000, 2004). La masticazione del tessuto fogliare da parte dell'insetto erbivoro provoca all'interno della cellula vegetale un cambiamento del potenziale di membrana che genera dei segnali elettrici e idraulici, che viaggiano attraverso la pianta, amplificando a livello sistemico e locale il segnale di pericolo percepito. In seguito alla percezione di tali segnali, tra i primi cambiamenti che si osservano c'è l'aumento di calcio citosolico, un importante messaggero secondario coinvolto nella trasduzione del segnale. Le variazioni di concentrazione del calcio citosolico sono percepite e trasmesse a valle mediante l'azione di diverse proteine sensibili al calcio (Lecourieux et al., 2006). Tra queste vi sono le calmoduline, proteine chinasiche dipendenti dal calcio (CDPK) e proteine di legame al calcio con un motivo EF. Le proteine CDPK sono quelle più interessanti poiché diversi studi hanno dimostrato il loro coinvolgimento nelle risposte di difesa a stress di tipo biotico e abiotico (Mori et al., 2006; Romeis et al., 2001). Inoltre, l'aumento dei livelli di calcio intracellulare si associa alla maggiore produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e ossido nitrico (NO). Ad esempio in patata, l'enzima NADPH ossidasi viene fosforilato per azione di due CDPK calcio-dipendenti, con conseguente attivazione dell'enzima ed aumento della produzione di ROS (Kobayashi et al., 2007). In piante di soia si osserva un considerevole aumento nei livelli di ROS in seguito al danno provocato da *Helicoverpa zea* (Bi e Felton, 1995). In piante di pomodoro, l'inibizione farmacologica dell'enzima NADPH ossidasi o l'espressione di molecole antisense dirette verso il gene RBOH (*Respiratory Burst Oxidase Homologues*), determina una riduzione dei livelli dei trascritti di geni correlati alla difesa, come gli IP e PPO (Orozco-Cardenas et al., 2001, Sagi et al., 2004). Oltre alla produzione di queste molecole segnale, in seguito al danno, si ha l'attivazione delle MAP-chinasi, importanti nelle risposte di difesa agli erbivori. Per esempio, mutanti di *Arabidopsis* per il gene *ap2c1*, il quale codifica per una serintreonina fosfatasi di tipo 2C in grado di inattivare le chinasi, MPK6 e MPK4, producevano più alti livelli di acido giasmonico e risultavano essere resistenti all'acaro *Tetranychus urticae* (Schweighofer et al., 2007). Inoltre, in diversi studi è stato osservato un incremento dei livelli di espressione di geni codificanti per le MAP chinasi in seguito all'attacco di *Bemisia tabaci* in *Arabidopsis*, di *Nilaparvata lugens* in riso e di *Manduca sexta* in *Nicotiana attenuata* (Kempema et al., 2007; Wu et al., 2007; You et al., 2007). In particolare è stata caratterizzata una MAP chinasi direttamente responsabile della produzione di acido giasmonico dopo ferita, denominata WIPK (Wound-Induced Protein Kinase). Tale proteina è probabilmente coinvolta nella cascata di segnali che portano all'attivazione di desaturari omega-3, enzimi che convertono l'acido linoleico ad acido linolenico (Kodama et al., 2000). Questa cascata di segnali termina con l'attivazione delle fosfolipasi A2 e D (Ryan, 2000). Queste fosfolipasi agiscono sui fosfolipidi di membrana rilasciando acidi grassi polinsaturi, quali l'acido linoleico e l'acido linolenico (Narvaez-Vasquez et al., 1999). Dopo una serie di reazioni catalizzate da enzimi localizzati nei cloroplasti, quali lipossigenasi (LOX), allene ossido sintasi (AOS), e allene ossido ciclasti (AOC), si ha la formazione dell'acido 12-ossido-10,15(Z) fitodienoico (OPDA). Tale composto viene trasportato nei perossisomi dove subisce una riduzione per azione dell'enzima OPDA reduttasi (OPR) e dopo tre step successivi di  $\beta$ -ossidazione si ha la produzione dell'acido jasmonico (Wasternack, 2007). Recentemente sono state identificate diverse proteine in grado di regolare la produzione dell'acido giasmonico e quelle risposte trascrizionali indotte da questo ormone. La proteina COI1, componente della F-box del complesso E3 ubiquitina-ligasi, denominato SCF<sup>COI1</sup>, funge da recettore dell'acido giasmonico, mentre la proteina JAZ (jasmonate ZIM

domain) agisce da repressore per i fattori trascrizionali che rispondono a tale ormone (Yan J et al., 2009; Chini et al., 2007). Quando la proteina COI1 lega l'acido giasmonico, esso interagisce fisicamente con la proteina JAZ promuovendone l'ubiquitinizzazione, mediata da SCF<sup>COI1</sup>, con conseguente degradazione di questo repressore ad opera del proteasoma 26S. I più bassi livelli di JAZ, stimolati da ferita o attacco di agenti patogeni, determina il rilascio di quei fattori di trascrizione rispondenti all'acido giasmonico, come MYC2 e conseguente attivazione delle risposte di difesa primarie (Wu e Baldwin, 2010).

La regolazione della produzione dell'acido giasmonico dopo ferita o attacco d'insetti fitofagi è particolarmente importante per le abilità della pianta di dare l'avvio tempestivamente alle risposte di difesa.

### **3.3.2 L'interazione pianta-insetto fitomizo**

Molti degli studi sull'interazione pianta-insetti succhiatori riguardano le risposte di difesa contro gli afidi. Questo è probabilmente dovuto al fatto che gli afidi sono i succhiatori delle piante più dannosi e quindi, a causa del loro impatto sull'agricoltura, è importante identificare i fattori che regolano la resistenza o la suscettibilità delle piante a questi insetti. Il tipo d'interazione che si stabilisce tra la pianta e gli insetti succhiatori, rappresenta un elegante caso di specializzazione, in quanto questi insetti utilizzano una raffinata strategia di alimentazione instaurando un unico sito di alimentazione che può durare per ore sulle piante ospiti (Will et al., 2007). Gli afidi sono capaci di alimentarsi dai tessuti vascolari della pianta, come il floema, utilizzando un apparato boccale di tipo pungente succhiatore, denominato stiletto, costituito da due mandibole esterne e due mascelle interne che vanno a formare un canale alimentare, che consente di ingerire grandi quantità di fluidi dal floema, e un canale salivare in grado di emettere saliva con funzione predigerente nel sito di alimentazione (Miles, 1999). Essi rilasciano due tipi di secrezioni salivari: gelatinosa e acquosa. Durante la fase di "probing" la secrezione acquosa viene rilasciata sulla superficie fogliare e al sito di puntura per poi essere riassorbita mediante il canale alimentare, in modo da consentire l'assaggio dell'ambiente cellulare prima dello stabilirsi del sito di alimentazione (Powell et al., 2006; Walling, 2008). La saliva svolge un ruolo molto importante nel mantenere il sito di alimentazione e sembra essere la fonte di elicitori ed effettori che sono coinvolti nell'attivazione delle risposte di difesa in pianta. La composizione molecolare sembra dipendere dalla specie dell'insetto e dalla pianta ospite (Habibi et al., 2001). La saliva può contenere proteine di legame al calcio, lipasi, perossidasi, fenolossidasi, amilasi, cellulasi, proteasi, pectinasi (Will et al., 2007; Miles, 1999). Ognuna di queste proteine contribuisce alla formazione del sito di alimentazione. Ad esempio, gli enzimi idrolitici (pectinasi, cellulasi, amilasi) facilitano il dissolvimento della parete cellulare favorendo in tal modo il movimento intra-intercellulare dello stiletto. Ossidasi salivari quali, perossidasi e fenolossidasi, mantengono delle condizioni redox ottimali per l'alimentazione (Miles e Oertli, 1993). Poiché dal tessuto danneggiato si ha il rilascio di composti fenolici la cui tossicità dipende dalle condizioni redox della cellula, tali enzimi promuovono la polimerizzazione dei monomeri fenolici e dei derivati in oligomeri inerti, fornendo un ambiente meno tossico all'afide (Walling, 2009). Inoltre, proteine di legame al calcio agiscono andando a chelare gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  che sono rilasciati in seguito al danno provocato dalla penetrazione dello stiletto nei tessuti del floema. Il blocco di tali ioni previene la coagulazione dei forisomi, strutture che si accumulano al sito di danno in risposta ai cambiamenti redox e l'incremento di calcio

citosolico, e impedendo il blocco del canale alimentare afidico (Will e Van Bel, 2006). La secrezione gelatinosa, invece agisce andando a formare una barriera che fornisce protezione allo stiletto dai tessuti dell'ospite e un canale attraverso cui poter transitare (Walling, 2008). Essa è costituita da proteine (tra cui fenolossidasi, perossidasi, pectinasi e  $\beta$ -glucosidasi), fosfolipidi e carboidrati coniugati (Cherqui et al., 2000).

Vi sono diverse strategie utilizzate dalla pianta per fronteggiare l'attacco degli afidi. Tra le caratteristiche della pianta che possono influenzare negativamente la performance di una popolazione afidica ricordiamo le proprietà strutturali della superficie fogliare e della parete cellulare, proteine e metaboliti secondari che hanno un'azione antixenotica o antibiotica, e la produzione di volatili che possono avere funzione repellente o attrarre i nemici naturali degli afidi (Goggin, 2007). Simmons et al. (2003) hanno osservato che in *Lycopersicon* spp., la presenza di tricomi ghiandolari è associata con la resistenza a diverse specie di artropodi, incluso gli afidi tra cui *Myzus persicae*; invece uno studio condotto da Margaritopoulos et al. (2005) hanno mostrato che la produzione di volatili sulla superficie fogliare o nel tessuto subcutaneo scoraggia il processo di "probing" dell'afide. Inoltre, la resistenza all'afide può essere associata a strutture preformate o a metaboliti prodotti nell'epidermide, nel floema, nel mesofillo o ad una combinazione di questi tessuti, come è stato recentemente dimostrato con studi condotti con differenti accessioni di *Solanum* (Alvarez et al., 2006). Molte lectine di pianta (Sylwia et al., 2006; Wu et al., 2006) e inibitori di proteasi (Ribeiro et al., 2006; Rahbe et al., 2003) possono avere un'azione antibiotica sull'afide, ed è stato anche ipotizzato che alcune proteine del floema possono agire contro l'afide andando a occludere il sito di alimentazione (Caillaud et al., 1996).

### 3.3.2.1 I geni di resistenza ad afidi

La resistenza mediata dai geni di resistenza R è un sistema di sorveglianza che la pianta sfrutta per riconoscere e fronteggiare l'attacco da parte di agenti dannosi che sono in grado di superare le barriere fisiche. Numerosi geni R, caratterizzati da un motivo NBS-LRR (Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat), conferiscono resistenza in seguito al riconoscimento di una specifica proteina effettrice rilasciata da un agente patogeno. Nella mediazione della resistenza della pianta agli afidi è stato proposto un simile meccanismo di azione (Smith e Boyko, 2006). Analisi genetiche condotte sia su monocotiledoni che dicotiledoni hanno indicato che la resistenza della pianta agli afidi può essere mediata dai prodotti dei geni di resistenza (Kaloshian, 2004; Goggin, 2007). Ad oggi due sono i geni di resistenza ad afidi che sono stati isolati e clonati. Gli studi condotti suggeriscono che la resistenza della pianta è mediata dal riconoscimento di una molecola effettrice dell'afide che stimola quella cascata di segnali che rapidamente attivano le risposte di difesa della pianta contro tali insetti, seguendo un schema ampiamente descritto nell'interazione pianta-patogeno. Il primo gene, *Mi-1*, è stato isolato dalla specie selvatica di pomodoro *Solanum peruvianum* come fonte di resistenza a tre specie di nematodi del genere *Meloidogyne*. Tale gene mostra un'azione ad ampio spettro perché conferisce resistenza anche all'afide della patata, *Macrosiphum euphorbiae* (Rossi et al., 1998), a due biotipi di mosca bianca (*Bemisia tabaci*) (Nombela et al., 2003), e alle psillide della patata (*Bactericerca cockerelli*) (Casteel et al., 2006). L'altro gene di resistenza, *Vat*, è stato identificato in melone, ed è in grado di conferire resistenza all'afide *Aphis gossypii* e al virus del mosaico del cetriolo quando trasportato da *A.*

*gossypii* (Pauquet et al., 2004). Entrambi questi geni codificano per proteine strutturalmente simili, costituite da diversi motivi strutturali tra cui un sito di legame a nucleotidi (NBS) e ripetizioni ricche in leucina (LRR) all'estremità carbossi-terminale. Il prodotto del gene *Mi-1* differisce dal gene *Vat* in quanto possiede all'estremità N-terminale del dominio NBS un'estensione ricca in leucina di circa 200 aminoacidi, che sembra giocare un ruolo importante nella regolazione della trasduzione del segnale e nella morte cellulare (Hwang e Williamson, 2003). In contrasto tale porzione N-terminale è più breve nella proteina codificata dal gene *Vat*, ma la porzione C-terminale di quest'ultimo, comprende quattro ripetizioni quasi perfette di 65 aa fiancheggiate da copie altamente imperfette del motivo LRR, assente in *Mi-1*. Entrambi i geni di resistenza *Mi* e *Vat* codificano per proteine con una putativa localizzazione citoplasmatica (Dogimont et al., 2010). Recentemente sono stati identificati anche altri putativi geni di resistenza agli afidi che codificano per proteine con un dominio NBS-LRR. Per esempio, due geni R in *Medicago truncatula* che conferiscono resistenza agli afidi *Acyrtosiphon kondoi* (AKR) e *Therioaphis trifolii f. maculata* (TTR) sono stati mappati e associati a geni NBS-LRR (Klingler et al., 2005). In soia, i geni di resistenza contro l'afide *Aphis glycines* sono stati mappati in una regione di 115 kb, contenente due putativi geni TIR-NBS-LRR (Kim et al., 2010).

La resistenza all'afide si può manifestare attraverso diversi meccanismi che dipendono dalla pianta ospite e dal biotipo di afide.

Ad esempio, i livelli di resistenza conferiti dal gene *Mi-1* sembrano limitarsi solo ad alcuni biotipi di *M. euphorbiae* (Goggin et al., 2001) e variano con l'età della pianta (Hebert et al., 2007). Inoltre, anche se tale proteina è costitutivamente espressa sia nelle radici sia nelle foglie, la resistenza mediata da tale gene differisce a secondo dell'insetto erbivoro contro cui è diretto. Infatti, piante di pomodoro contenente il gene *Mi-1* sono resistenti all'attacco dei nematodi già nelle prime fasi di sviluppo delle radici e tale resistenza è accompagnata dalla formazione di necrosi al sito di alimentazione dovute allo sviluppo di una reazione di ipersensibilità, in seguito alla quale il nematode smette di nutrirsi (Martinez de Ilarduya et al., 2003; Milligan et al., 1998). Dall'altro lato, la resistenza all'afide *M. euphorbiae* si sviluppa in piante di pomodoro di quattro o cinque settimane di età e solo nelle foglie completamente espanse, a prescindere dalla loro posizione. Inoltre, la reazione d'ipersensibilità non sembra essere il meccanismo che sta alla base della resistenza all'afide poiché su foglie di pomodoro infestate, non si ha lo sviluppo di aeree necrotiche, ma probabilmente la resistenza si manifesta tramite un meccanismo di antibiosi/antixenosi che va ad alterare sia il comportamento dell'insetto sia il suo potenziale biotico (crescita, sviluppo e riproduzione) (Kaloshian et al., 2000). Sempre il gruppo di Kaloshian ha osservato che l'afide *M. euphorbiae* si nutre per un più limitato periodo su piante di pomodoro resistenti (*Mi+*) (Kaloshian et al., 2000). Infatti, gli afidi sono in grado di raggiungere il floema e il flusso di fotosintetati, ma molto presto cessano di nutrirsi e muoiono per mancanza di cibo. Sebbene la resistenza mediata dal gene *Mi*, possa fortemente ridurre la popolazione afidica, essa non è in grado di bloccare completamente la colonizzazione e riproduzione sulle piante resistenti. Un ulteriore aspetto da considerare è che il trasferimento del gene *Mi-1* in piante di *Solanum melongena* è in grado di conferire la resistenza contro i nematodi ma non verso l'afide, suggerendo che nelle risposte di difesa contro l'afide entrano in gioco anche altre proteine/molecole che non sono conservate tra il pomodoro e la melanzana (Goggin et al., 2006). La resistenza, invece ai due biotipi di mosca bianca e alla psillide sembra essere di natura antixenotica, in quanto la capacità di colonizzazione e riproduzione sono compromesse (Casteel et al., 2006; Nombela et al.,

2001). Nonostante questa diversa modalità di azione, il locus Rme1, che è stato proposto come il target dell'effettore, è richiesto per lo sviluppo della resistenza ai nematodi, afidi e mosca bianca (Martinez de Ilarduya et al., 2001, 2003). Un simile meccanismo di resistenza di tipo antixenotico è stato descritto anche per il gene *Vat* in melone, in grado di ridurre la fecondità dell'afide *A. gossypii* di circa l'80-90% in tre giorni (Thomas et al., 2008). Inoltre sempre in melone, Villada et al. (2009) hanno osservato lo svilupparsi di una reazione d'ipersensibilità, in seguito all'attacco di *A. gossypii*, anche se non seguita dalla formazione di aeree necrotiche visibili al sito di alimentazione.

Come questi geni possano essere coinvolti nello sviluppo della resistenza non è ancora del tutto chiaro, ma la cascata di segnali attivata dai geni di resistenza inizia ad essere compresa ed i vari studi condotti indicano un altro grado di sovrapposizione con il network di fitormoni, chinasi, chaperonine, e ROS attivati in seguito all'attacco di agenti patogeni (Walling, 2009). Data la grande diversità di risposte che si possono ottenere, è lecito aspettarsi che cascate di eventi qualitativamente e quantitativamente differenti possono essere innescati in pianta in dipendenza della specie afidica e vegetale coinvolte nell'interazione.

### **3.3.2.2 Pathway molecolari agenti in pianta dopo attacco dell'afide**

Nonostante i limitati danni meccanici subiti, le piante sono in grado di riconoscere e attivare specifiche risposte metaboliche e trascrizionali contro gli attacchi degli insetti fitomizi (de Vos et al., 2005). Passi in avanti sono stati compiuti negli ultimi anni nella comprensione dei pathway molecolari che operano durante l'interazione pianta-afide grazie a studi trascrittomici (Thompson e Goggin, 2006; de Vos et al., 2005; Kusnierczyk et al., 2007; Li et al., 2008). Recentemente sono stati proposti due differenti processi che sono in grado di promuovere le risposte della pianta in seguito ad attacco afidico (Smith e Boyko, 2006). Il primo coinvolge l'interazione "gene per gene" in cui una proteina del gene di resistenza presente in pianta riconosce direttamente o indirettamente una molecola prodotta dall'afide. Tale evento di riconoscimento induce nella pianta delle risposte di difesa che sono atte a impedire lo stabilirsi dell'insetto. In assenza di un gene di resistenza, la pianta si affida alla percezione del danno fisico e stress meccanico causato durante la penetrazione dello stiletto nei tessuti fogliari e/o la percezione di molecole che sono presenti nelle secrezioni salivari (Goggin, 2007; Will et al., 2007). Questo processo di riconoscimento induce la produzione di diverse molecole segnale come l'acido salicilico (SA), l'acido jasmonico (JA), l'etilene (ET), le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'ossido nitrico (Kaloshian e Walling, 2005). Le risposte della pianta agli insetti fitomizi appaiono molto complesse. Diversi studi trascrittomici realizzati per studiare i cambiamenti genici indotti dall'afide, hanno rivelato che molti dei geni differenzialmente espressi codificano sia per proteine potenzialmente coinvolte nella difesa (come le proteine correlate alla patogenesi o inibitori di proteasi) sia per proteine coinvolte nel rafforzamento della parete cellulare, negli stress ossidativi, nel metabolismo primario e secondario e nella fotosintesi (Delp et al., 2009). Qubbaj et al. (2005), tramite analisi cDNA-AFLP, hanno cercato di investigare le risposte trascrizionali di cultivars resistenti e suscettibili di *Malus domestica* contro l'afide del melo *Dysaphis plantaginea*. I geni identificati nelle piante resistenti rispetto a quelle suscettibili hanno mostrato omologia con geni coinvolti nelle risposte di difesa a stress biotici o abiotici suggerendo che essi potrebbero giocare un ruolo importante anche nei meccanismi di resistenza della pianta contro afidi. Similmente,

l'infestazione di tre ecotipi di *Arabidopsis* con *Myzus persicae* e *Brevicoryne brassicae* induce una moltitudine di cambiamenti trascrizionali, molti dei quali connessi a geni correlati alle risposte agli stress (Kusnierczyk et al., 2007). In *Arabidopsis*, è stato osservato che le alterazioni indotte da *M. persicae* erano ridotte a un minor numero di geni, dopo 2 e 36h dall'infestazione, coinvolti principalmente nella trasduzione del segnale, nel metabolismo e nelle modificazione della parte cellulare così come nelle risposte a stress ossidativi e contro patogeni (Couldridge et al., 2007). Anche Kusnierczyk et al., (2008), mediante uno studio trascrittomico a differenti tempi d'induzione, hanno evidenziato che *B. brassicae* era in grado di provocare cambiamenti di geni coinvolti nei pathway dei ROS, SA, JA, evidenziando ancora una volta un possibile ruolo di queste molecole nelle risposte di difesa contro gli afidi.

L'acido salicilico sembra giocare un ruolo primario nell'attivazione delle risposte di difesa contro gli afidi (Kempema et al., 2007; Zarate et al., 2007). È noto che il pathway dell'acido salicilico spesso contribuisce alla resistenza mediata dai geni di resistenza, mentre l'acido jasmonico e l'etilene giocano un ruolo centrale nell'attivazione dei pathway di segnale a ferita (Mantelin et al., 2009). Il ruolo di questi ormoni in pomodoro è stato ampiamente investigato mediante approcci farmacologici e di genetica inversa. Li et al. (2006) hanno osservato che piante transgeniche di pomodoro per il gene *NahG*, gene in grado di sopprimere l'accumulo dell'acido salicilico, mostravano un'incrementata suscettibilità a *M. euphorbiae* durante lo stabilirsi di un'interazione di tipo compatibile, mentre era del tutto soppressa la resistenza in quelle piante portanti il gene *Mi*. Tuttavia, tale resistenza poteva essere ristabilita per mezzo di applicazioni di un analogo dell'SA, ponendo l'accento sull'importanza di tale ormone nella resistenza contro afidi. Inoltre, tramite un approccio di silenziamento genico mediato da virus (VIGS), è stato dimostrato il coinvolgimento di una MAPK chinasi (LeMKK2) e di altre MAPK (LeMPK2 e LeMPK1, o LeMPK3) nell'attivazione della resistenza mediata dal gene *Mi* (Li et al., 2006). È noto che l'induzione di geni codificanti per proteine correlate alla patogenesi (PR) sono localmente e sistematicamente associate con la risposta agli afidi in diverse piante. Diversi studi hanno dimostrato come l'infestazione di piante di *A. thaliana* e *A. graveolens* con l'afide *Myzus persicae*, e cultivar suscettibili di sorgo con l'afide *Schizaphis graminum*, determinavano cambiamenti nei livelli di espressione di geni PR come  $\beta$ -1,3 glucanase, PR-1 e PR-2, chitinasi e proteine hevein-like (Moran e Thompson, 2001, Moran et al., 2002, Zhu-Salzman et al., 2004, Divol et al., 2005). In pomodoro, è stato osservato un più rapido e maggiore accumulo dei trascritti della proteina PR-1 nelle piante resistenti che in quelle suscettibili (Martinez de Ilarduya et al., 2003). Inoltre, il danno provocato da *M. euphorbiae*, induce in pomodoro l'espressione di un'altra proteina PR, P4 (Fidantsef et al., 1999). Anche in piante di *Hordeum vulgare*, l'attacco dell'afide *Rhopalosiphum padi* è in grado di elicitare l'espressione di proteine PR come  $\beta$ -glucanase, PR1, e la proteina traumatina-like (Delp, 2009). Tuttavia, in seguito all'attacco di *Diuraphis noxia* a piante resistenti di *Triticum aestivum* non è stata osservata l'induzione di geni codificanti per proteine PR (Boyko et al., 2006), così come l'afide *Schizaphis graminum* determinava una sottoespressione di tali geni in piante di *Sorghum bicolor* (Park et al., 2006).

Dall'altro lato l'acido jasmonico sembra avere ruoli apparentemente contrastanti in differenti interazioni pianta-afide. La crescita dell'afide *M. persicae* è significativamente ridotta su mutanti *cev1* di *Arabidopsis*, in cui il pathway di segnale dell'acido jasmonico è costitutivamente attivo, indicando che tale ormone aumenta



la resistenza in tale piante (Ellis et al., 2001). Inoltre, geni coinvolti nella sintesi dell'acido giasmonico e nelle risposte mediate da quest'ormone, come lipossigenasi (LOX), citocromo P450, sono indotti dal danno provocato dall'alimentazione di *M. nicotianae* su foglie di *Nicotiana attenuata* (Voelckel et al., 2004) e da *D. noxia* in piante di *S. graminum* (Park et al., 2006; Boyko et al., 2006). Anche in pomodoro, in seguito all'attacco dell'afide *M. euphorbiae*, si osservava un'induzione locale di geni dipendenti dall'acido giasmonico, quali gli inibitori di proteasi PinI e PinII, suggerendo un ruolo di tale ormone nella difesa (Martinez de Ilarduya et al., 2003). Ciò nonostante, in studi condotti con mutanti di pomodoro per il gene *jai1-1* (*Jasmonic Acid Insensitive 1*), compromessi nella percezione dell'acido giasmonico, è stato osservato che tale mutazione nelle piante resistenti e suscettibili non influenzava né la resistenza mediata dal gene *Mi* né le difese basali della pianta all'afide *M. euphorbiae* (Thompson e Goggin, 2006). Di contro, si osservava un effetto a livello del comportamento dell'afide, dal momento che le piante portanti tale mutazione, mostravano un più alto grado di colonizzazione dell'afide rispetto alle piante controllo, indicando che l'acido giasmonico potrebbe avere un ruolo indiretto nelle difese della pianta influenzando la selezione della pianta ospite da parte dell'afide (Bhattarai et al., 2007). È molto probabile che il ruolo dell'acido giasmonico e dell'acido salicilico nell'interazione pianta-afide possa variare secondo la specie della pianta. Ad esempio in mutanti di *Arabidopsis* per il gene *EDS5* (*Enhanced Disease Susceptibility 5*), coinvolto nella biosintesi di SA, e il gene *NPR1* (*Non Expresser of PR genes 1*), coinvolto nella trasduzione del segnale del SA, la resistenza contro *Myzus persicae* non veniva compromessa, implicando che tale ormone non ha un ruolo primario nelle difese dirette contro questo insetto (Moran and Thompson, 2001). Inoltre, su mutanti di pomodoro per il gene *spr2*, incapaci di sintetizzare acido giasmonico in quanto mutato in una desaturasi omega-3 (Li et al., 2003), la sopravvivenza e la fecondità dell'afide erano drasticamente ridotte, probabilmente in seguito ad incrementi nelle risposte attivate dall'acido SA (Thompson e Goggin, 2006). Sebbene molti studi evidenzino una sovrapposizione tra le risposte di difesa contro gli afidi e i patogeni, esistono anche evidenze di una divergenza in queste difese. Ad esempio in *Arabidopsis*, il gene *PAD4* (*Phytoalexin Deficient 4*), che codifica per una putativa lipasi in grado di modulare il pathway di segnale dell'acido salicilico, regola l'attivazione del processo di senescenza nelle foglie infestate dall'afide *Myzus persicae*, contribuendo allo sviluppo della resistenza contro questo insetto (Pegadaraju et al., 2005). Lo sviluppo di tale resistenza sembra essere indipendente dalla proteina EDS1 (*Enhanced Disease Susceptibility 1*), una proteina che interagisce con PAD4 e interviene durante le difese attivate contro agenti patogeni (Pegadaraju et al., 2007).

A oggi sono pochi gli studi che suggeriscono un ruolo dell'ET nell'indurre risposte di difesa contro gli afidi. Tuttavia, la produzione di tale ormone incrementa significativamente su piante di orzo e grano resistenti, rispetto a piante suscettibili, in seguito ad attacco di *Schizaphis graminum* (biotipo C) e *Diuraphis noxia*, rispettivamente (Argandona et al. 2001; Boyko et al. 2006). Inoltre, geni che codificano per proteine coinvolte nella biosintesi dell'ET, come ACC ossidasi e gli elementi di risposta all'etilene, sono sovraespressi in piante di *Arabidopsis* e *Apium graveolens* (Moran et al. 2002; Divol et al. 2005). In pomodoro, l'etilene sembra non avere un ruolo chiave nelle risposte mediate dal gene di resistenza *Mi*, ma sembra agire a livello delle risposte basali della pianta, andando a diminuire la suscettibilità delle piante all'afide (Mantelin et al., 2009). In contrasto, in *Arabidopsis* e *Nicotiana attenuata* in risposta a *M. persicae* i livelli di tale ormone non sembrano subire

cambiamenti (Ambros et al., 2003; Heidel e Baldwin, 2004; de Vos et al., 2005). In *Arabidopsis*, *M. persicae* e *Brevicoryne brassicae* (L.) mostrano una maggiore fecondità su piante wildtype rispetto ai mutanti ETR1, insensibili all'ET (Mewis et al., 2005, 2006). Alcuni studi hanno dimostrato che l'etilene possa agire in maniera sinergica o antagonistica, aumentando alcune risposte dipendenti dall'acido salicilico e jasmonico, ma inibendone altre (Rojo et al., 2003). Gli enzimi rilasciati nella cellula con le secrezioni salivari, quali enzimi che degradano la pectina, facilitano il rilascio di OGA dalla parete cellulare con conseguente produzione locale e sistemica delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Tjallingii, 2006). Geni coinvolti nella trasduzione del segnale ossidativo attraverso il controllo dei livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, come per esempio ossidasi, catalasi, glutammato sintasi, e proteine carrier-ATP/ADP, sono sovraesprese in piante di grano (Boyko et al., 2006) e sedano (Divol et al., 2005). Comunque, in altre combinazioni di pianta-afide tali geni risultano down regolati (Moran e Thompson, 2001; Moran et al., 2002; Park et al., 2006). La pianta, cerca di trovare un equilibrio tra la produzione di queste specie reattive e i meccanismi per la loro detossificazione. Come presentato in precedenza, i cambiamenti trascrizionali indotti dopo infestazione con differenti specie di afidi, non si all'alterazione di quei pathway di segnali quali JA, SA, ET e ROS ma si manifestano anche ad altri livelli, mediante cambiamenti di geni coinvolti nelle modificazioni della parete cellulare (Divol et al., 2005; Kusnierczyk et al., 2008); nel trasporto dell'acqua, nella biosintesi di vitamine, nella fotosintesi, nel metabolismo del carbonio e azoto (Voelckel et al., 2004; Qubbaj et al., 2005; Delp et al., 2009; Zhu-Salzman et al., 2004). Questi cambiamenti possono essere interpretati come strategie messe in atto sia dalla pianta per alterare il valore nutrizionale della linfa floematica sia dall'afide adattare la composizione della linfa floematica alle proprie richieste nutrizionali.

### **3.4 La pianta come mediatore nelle risposte tra gli insetti del suolo e della parte aerea**

In natura, così come in campo, le piante raramente sono attaccate da una singola specie erbivora ma, è molto più probabile che debbano far fronte alla sfida lanciata da diversi insetti dannosi. Questi possono attaccare la pianta contemporaneamente o in modo sequenziale, andando ad influenzare, in primo luogo, le difese primarie della pianta ospite (Van der Putten et al., 2001; Bezemer e Van Dam, 2005), e indirettamente la capacità di crescita, di sviluppo e di sopravvivenza dell'uno e/o l'altro insetto, quando essi si alimentano dalla stessa pianta ospite (Poveda et al., 2003; Soler et al., 2005; Rasmann e Turlings, 2007; Soler et al., 2007). Queste interazioni possono verificarsi tra membri di specie che hanno diverse modalità di alimentazione e che attaccano diverse parti della pianta. In tale contesto le piante giocano quindi un ruolo chiave come mediatori nell'interazione tra insetti dannosi.

Negli studi d'interazione tra le piante e gli insetti, molto del lavoro si è focalizzato nel recente passato sulle risposte indotte solo da una specie di attacco. Oggi, è sempre più forte la consapevolezza che gli insetti erbivori possono interagire anche quando sono temporalmente e spazialmente separati da altri erbivori che stanno condividendo la stessa pianta ospite (Gange e Brown, 1989; Masters, 1995; Masters e Brown, 1992; Gange, 2001; Masters et al., 2001). Dai primi studi, che hanno concentrato la loro attenzione sullo studio dell'effetto degli insetti del suolo su quelli della parte aerea, è emerso che su piante contemporaneamente attaccate da insetti delle radici, gli insetti della parte aerea, come ad esempio gli afidi, mostrano una migliore performance e facilità di alimentazione (Masters 1995; Masters e Brown

1992; Gange 2001). È stato postulato che tale effetto positivo è collegato ad una riallocazione dei metaboliti primari in altri compartimenti della pianta ospite. Tale modificazioni e/o alterazioni della fisiologia della pianta sono indotte dallo stress idrico causato dal danno dell'insetto terricolo, che implicano un aumento delle quantità di azoto solubile e di carboidrati nei germogli. È stato proposto che tale incremento nei livelli di nutrienti stimoli la performance degli insetti della parte aerea (Gange e Brown, 1989; Poveda et al., 2003). Recentemente, Johnson et al. (2009) hanno osservato un'interazione positiva di tipo bidirezionale tra il coleottero *Agriotes lineatus* e l'afide *Rhopalosiphum padi* quando entrambi presenti su piante di *Hordeum vulgare*. La presenza delle larve dell'elateride promuoveva la crescita della popolazione afidica così come l'afide determinava un incremento della massa di *Agriotes*, effetto dovuto a cambiamenti nella fisiologia della pianta con successivo miglioramento della qualità nutritiva della pianta per entrambi gli insetti erbivori. In contrasto, Wurst et al. (2007) non hanno evidenziato alcun effetto sulla performance di *Myzus persicae* quando si alimentava su piante di *Plantago lanceolata* contemporaneamente attaccate da *Agriotes*. Ricerche successive hanno evidenziato, invece, un effetto negativo da parte dell'insetto del suolo sulle prestazioni degli insetti che attaccano la parte aerea, azione che potrebbe essere mediata dall'induzione sistemica dei metaboliti secondari della pianta nei germogli così come in parti non danneggiate (Bezemer e van Dam, 2005; Kaplan et al., 2008; van Dam et al., 2003). Solitamente la pianta risponde all'attacco degli insetti dannosi mediante la produzione di molecole segnale che trasportate in diversi tessuti ed organi, sono poi in grado di innescare cambiamenti nei livelli dei metaboliti di difesa (Staswick e Tiryaki, 2004; Heil e Ton, 2008). Diversi studi hanno dimostrato come il danno provocato alle radici da parte degli insetti erbivori determina un miglioramento dello stato difensivo della parte aerea, mediante l'accumulo di metaboliti secondari in tessuti quali foglie giovani e fiori o viceversa (van Dam et al., 2003; Bezemer et al., 2004; Bezemer e van Dam, 2005; Kaplan et al. 2008). Ad esempio, il contenuto di nicotina nelle foglie di piante di tabacco incrementa quando le radici sono infestate dal nematode *Meloidogyne incognita* (Van Dam et al., 2001). Il danno provocato da *Agriotes lineatus* su piante di cotone determina un incremento dei livelli di terpenoidi nelle radici così come nelle foglie giovani con conseguente riduzione della crescita delle larve di *Spodoptera exigua* che si nutrono sulle stesse piante (Bezemer et al., 2003). Inoltre, l'attacco di *Diabrotica virgifera virgifera* su piante di mais determina lo sviluppo della resistenza contro l'insetto erbivoro *Spodoptera littoralis* e il patogeno *Setosphaeria turcica*. Infatti, il danno provocato a livello radicale produce un incremento dei livelli di DIMBOA nei germogli, un accumulo di ABA sia locale che sistemico dopo attacco radicale (Erb et al., 2009). van Dam et al. (2005) hanno osservato che l'attacco del dittero *Delia radicum* su piante di *Brassica nigra* causava l'induzione basale di glucosinolati nei germogli, ma al momento dell'attacco di *Pieris rapae*, i livelli di tali composti incrementavano più fortemente nelle piante, sottoposte al duplice attacco suggerendo un fenomeno di "priming" attivato dall'insetto terricolo. In piante di *B. nigra* (Soler et al., 2007) e di mais (Rasmann e Turlings, 2007) è stata evidenziata una diminuzione nei germogli delle risposte di difesa indotte dagli insetti del suolo. Tale soppressione può anche rappresentare un beneficio per la pianta quando si trova a dover stabilire delle priorità in caso di risorse limitate (Erb et al., 2008). Questi studi più recenti sono in apparente contrasto con i precedenti che hanno dimostrato in modo convincente il beneficio tratto dagli insetti della parte aerea in seguito al danno alle radici (Masters e Brown, 1992; Masters, 1995). È necessario sottolineare che tali studi sono stati condotti esaminando il sistema

pianta-afide mentre gli altri hanno valutato l'interazione con insetti masticatori, tipicamente impiegando larve di lepidotteri. Ne deriva che è molto probabile che l'influenza dell'insetto terricolo sulla parte aerea dipende e varia anche dalla strategia di alimentazione adottata dall'insetto "aboveground" (Erb et al., 2008).

Dall'altro lato, è poco studiato l'effetto provocato dal danno degli insetti della parte aerea sulla resistenza agli insetti terricoli. Finora è stato osservato che il danno provocato dall'alimentazione degli insetti erbivori causa una diminuzione della capacità fotosintetica della pianta che si riflette su una minore produzione di biomassa nelle radici con conseguente inferiore performance dell'insetto terricolo (Master et al., 1993, 2001). Inoltre, l'attacco da parte di insetti masticatori a livello dei germogli è in grado di causare un incremento dei livelli dei composti di difesa nelle radici con conseguente resistenza agli insetti del suolo (Soler et al., 2007; Erb et al., 2011).

La presenza dell'insetto terricolo, può inoltre influenzare livelli trofici più alti, quali ad esempio i nemici naturali degli insetti della parte aerea (Masters et al., 2001; Rasmann et al., 2005; Soler et al., 2005; Qiu et al., 2009; Johnson et al., 2011). È stato evidenziato che l'effetto sul terzo livello trofico può essere causato da cambiamenti diretti, connessi all'alterazione della performance dell'ospite dovuta alla presenza dell'insetto erbivoro sulla stessa pianta ospite (Poveda et al., 2005; Jansen et al., 2009). In aggiunta, anche cambiamenti indiretti, come la quantità e la qualità del *blend* di volatili emessi dalla pianta contemporaneamente attaccata sia a livello radicale che dei germogli, possono influenzare le risposte e le scelte dell'insetto parassitoide. Ad esempio, l'insetto parassitoide percepisce la variazione nel *blend* di volatili, dovuto ad una minore quantità di volatili prodotti o ad un differente profilo, per identificare le piante non attaccate anche dall'insetto terricolo (Rasmann e Turlings, 2007; Soler et al., 2007). Data, quindi, la capacità di influenzare tutti i livelli trofici, lo studio delle interazioni tra la pianta e gli insetti "aboveground" e "belowground" è di rilevante importanza dal punto di vista ecologico. Ancora oggi rimane da chiarire se queste interazioni siano di natura adattiva e per quale livello trofico. Per quanto riguarda le basi fisiologiche e molecolari dell'interazione tra gli insetti aboveground e belowground, in letteratura sono disponibili informazioni ridotte, se comparate allo studio dell'interazione pianta-singola specie di insetto, e soprattutto apparentemente contraddittorie (Erb et al., 2008). Studi molecolari delle risposte di difesa della pianta contro i diversi tipi di attacco potrebbero affiancarsi e complementare i vari studi ecologici e soprattutto fornire informazioni importanti per la comprensione del comportamento delle piante quanto presenti in un sistema di allevamento in cui sono presenti diversi stress biotici. Ad esempio, il confronto dei livelli di espressione genica dopo attacco da parte di vari organismi, singolarmente o in combinazione, potrebbe aiutare a capire quali pathway di difesa giocano un ruolo fondamentale nell'attivazione delle risposte di difesa a seguito delle interazioni belowground e aboveground.

## 4. MATERIALI E METODI

### 4.1 Allevamento delle piante e degli insetti

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate piante di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) 'Microtom'. Tale varietà è stata impiegata in quanto mostra una taglia ridotta (Scott and Harbaugh 1989) ed altre caratteristiche utili per gli studi di laboratorio, quali la capacità di crescere ad alte densità (1,357 piante/m<sup>2</sup>), un ciclo vitale breve e la raccolta dei frutti maturi dopo circa 70-90 giorni dalla semina.

I semi sono stati posti a germinare all'interno di capsule Petri contenenti dischi di carta da banco umida. Le piastre sono state incubate in camera di crescita al buio ad una temperatura di 24°C per circa 5-6 giorni. In seguito, le plantule sono state trasferite in vasi di plastica di 14 cm di diametro, contenenti una miscela di terreno sterile e substrato di tipo S (Floragard) e poste in serra sotto gabbie anti-afidiche per 4 settimane dopo la germinazione, con luce naturale ed una temperatura di circa 24°C.

*Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae) è stato ottenuto da una popolazione mantenuta presso il Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria dell'Università di Napoli Federico II, e allevata su piante di *Solanum lycopersicum* cv. M82 in camere climatiche con una temperatura di 20 ± 1°C; umidità relativa di 65 ± 5% e un fotoperiodo di 18h di luce e 6h di buio.

Larve dell'insetto terricolo *Agriotes lineatus* (L.) (Coleoptera: Elateridae) sono state fornite dall'azienda Koppert (Olanda). Fino al loro utilizzo le larve sono state riposte all'interno di un terreno sabbioso umido, in una cella climatica con una temperatura di 10 ± 1°C al buio. L'afide generalista *Myzus persicae* (Rhyncho: Aphididae) è stato ottenuto da una popolazione cresciuta su piante di *Brassica rapa* (Brassicaceae) presso il laboratorio di Entomologia dell'Università di Wageningen, Olanda, ed è stato successivamente allevato su piante di *Solanum lycopersicum* cv Microtom in camere climatiche ad una temperatura di 22 ± 1°C; umidità relativa pari a 50 ± 5% e un fotoperiodo di 16h di luce e 8h di buio.

Il parassitoide *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiinae) è stato ottenuto da una popolazione mantenuta presso il laboratorio di Entomologia dell'Università di Wageningen, Olanda. Tale popolazione è stata allevata sul suo ospite *M. persicae* cresciuto su piante di *Brassica oleracea*. Da tale allevamento sono state raccolte le mummie, poste in tubi falcon, con poche gocce di miele sulle pareti del tubo, e trasferite in camera di crescita con una temperatura di 21 ± 1 °C fino al momento dell'emergenza. In seguito i parassitoidi emersi sono stati trasferiti nelle gabbie ove presente il suo ospite in modo da facilitare l'accoppiamento e l'acquisizione dell'esperienza di ovideposizione prima della prova.

### 4.2 Saggi di infestazione afidica e raccolta materiale vegetale

Per studiare le risposte di difesa della pianta all'attacco di insetti fitomizi sono stati eseguiti dei saggi di infestazione utilizzando come ospite piante di pomodoro di quattro settimane cv Microtom e come insetto l'afide *Macrosiphum euphorbiae*.

Il protocollo di infestazione adottato è stato impiegato per la produzione del materiale vegetale utilizzato per la valutazione sia dei cambiamenti trascrizionali che proteomici indotti nella pianta in seguito all'attacco dell'afide. Le piante controllo, per entrambi gli studi, sono state allevate nelle stesse condizioni sperimentali. Circa 10 ninfe di diversa età dell'afide *M. euphorbiae*, sono state gentilmente trasferite su due

delle foglie sub-apicali più espanse. Per lo studio trascrittomico le foglie delle piante infestate e delle piante controllo sono state raccolte a 24h, 48h e 96h dopo l'infestazione, previa rimozione dell'afide. Il materiale vegetale è stato congelato in azoto liquido per la successiva estrazione dell'RNA totale. Per lo studio proteomico, a 48h dall'infestazione le foglie sono state raccolte, previa rimozione dell'afide, e sono state congelate in azoto liquido per l'estrazione delle proteine totale.

### **4.3 Analisi microarray**

#### **4.3.1 Estrazione dell'RNA totale**

Per l'estrazione dell'RNA totale è stato utilizzato l'RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). Il tessuto fogliare è stato triturato in azoto liquido e 100 mg del materiale polverizzato sono stati trasferiti in tubi contenente 700 µl di QIAzol Lysis Reagent (Qiagen). I campioni sono stati omogeneizzati tramite agitazione per 5 minuti ed incubati a temperatura ambiente per 5 minuti. Successivamente, 140 µl di cloroformio sono stati aggiunti ad ogni campione. I tubi sono stati agitati vigorosamente e nuovamente incubati a temperatura ambiente per 3 minuti. In seguito è stata effettuata una centrifugazione a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il surnatante ottenuto è stato trasferito nelle "gDNA Eliminator spin columns" fornite dal RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) per favorire l'eliminazione del DNA genomico. L'RNA è stato purificato tramite l'uso delle RNeasy Mini spin columns (Qiagen), secondo le indicazioni della casa produttrice. Un'aliquota di RNA è stata utilizzata per la quantificazione tramite analisi allo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies). Il controllo della qualità e integrità dell'RNA estratto è avvenuto mediante elettroforesi capillare su RNA 6000 Nano Chip kit mediante lo strumento Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) secondo le istruzioni del produttore.

#### **4.3.2 Amplificazione e marcatura del cRNA**

I campioni di RNA con un rapporto di assorbanza 260/280 nm >1,8 e 260/230 >2, sono stati utilizzati per le fasi di marcatura. Per la sintesi del cRNA (RNA complementare) è stato utilizzato l'Agilent Low RNA Input Linear Amp Kit (Agilent Technologies). Per ogni reazione di marcatura sono stati impiegati 1.8 µl del T7 Promoter Primer Mix, 2 µl di una diluzione finale 1:4 di "RNA spike-in control", 300 ng di RNA totale, acqua sterile fino ad un volume di 11,5 µl. Dopo una prima fase di incubazione a 65°C per 10 minuti, ad ogni campione sono stati aggiunti 8.5 µl della cDNA Master Mix (5X First Strand Buffer, 0.1 M DTT, 10 mM dNTP mix, MMLV-RT, RNaseOut). La reazione è stata incubata a 40°C per 2 ore e poi a 65°C per 15 minuti. Successivamente i tubi sono stati trasferiti in ghiaccio per 5 minuti. Tale cDNA è stato impiegato come template per la sintesi delle molecole di cRNA marcate, quindi 60 µl della Transcription Master Mix (4X Transcription Buffer, 0.1 M DTT, NTP mix, 50% PEG, RNaseOut, Inorganic Pyrophosphatase, T7 RNA Polymerase, Cy3 o Cy5) sono stati aggiunti ad ogni campione e incubati a 40°C per 2 ore. Per rimuovere i nucleotidi marcati non incorporati, le reazioni sono state purificate con il RNeasy Mini Kit (Qiagen), secondo le indicazioni fornite dal produttore. La quantità di cRNA prodotto (ng/µL), le pmoli/µl di cianina incorporata e il rapporto di assorbanza 260/280 nm sono stati determinati tramite lettura allo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies). L'attività specifica, che fornisce una stima dell'efficienza di incorporazione delle pmoli di Cy3 o Cy5 per µg di cRNA sintetizzato, per ogni reazione è stata calcolata mediante la seguente formula:

(Concentrazione di Cy3 o Cy5 pmol/μl/ Concentrazione di cRNA ng/μl)\*1000 = pmol di Cy3 o Cy5 per μg di cRNA

#### 4.3.3 Ibridazione dei campioni e scansione degli array

Per le fasi di ibridazione sono stati utilizzati solo i campioni aventi un valore di attività specifica > 8. Una uguale quantità (825 ng) di cRNA del campione controllo (marcato con la Cy3) e del campione infestato (marcato con la Cy5) sono stati mescolati con 11 μl di 10x Blocking Agilent, 2,2 μl di 25x “Fragmentation Buffer” e 34,8 μl di acqua sterile. Ogni soluzione di ibridazione è stata miscelata e incubata al buio a 60°C per 30 minuti. Successivamente a ciascun tubo sono stati aggiunti 55 μl di 2x GEx Hybridization buffer HI-RPM raggiungendo un volume finale di 110 μl. La reazione è stata mescolata delicatamente, e centrifugata per un minuto a 13000 rpm. Una volta assemblata la camera di ibridazione, essa è stata incubata a 65°C per 17 ore con una velocità di rotazione di 10 rpm. Per l'ibridazione sono stati impiegati dei Tomato Gene Expression Microarray (4x44k) (Agilent Technologies), costituiti da 43,803 probe oligonucleotidiche di lunghezza pari a 60 bp. Per ogni tempo sperimentale (24, 48 e 96 ore dopo l'attacco afidico) i campioni sono stati ottenuti da tre piante controllo e da tre piante infestate e un pool dei campioni controllo è stato ibridato contro il campione infestato prelevato allo stesso tempo. Finita la fase di ibridazione gli array sono stati sottoposti a delle fasi di lavaggio con il “Gene Expression Wash buffer 1” (1 minuto a temperatura ambiente) e il “Gene Expression Wash buffer 2” (1 minuto a 37°C) (Agilent Technologies). Infine per asciugare gli array e prevenire la degradazione della marcatura, gli array sono stati trattati con lo Stabilization&Drying Solution (Agilent Technologies) per 30 secondi a temperatura ambiente. Dopo il lavaggio, i vetrini sono stati immediatamente letti con l'Agilent's Dual Laser Microarray Scanner (G2565AA) e l'immagine ottenuta è stata analizzata mediante il software Agilent Feature Extraction (Agilent Technologies). Tale software permette di estrarre i dati di intensità grezza di ciascuno spot unitamente ai valori di background.

#### 4.3.4 Analisi dei dati microarray

I dati dell'intensità grezza e l'informazione associata ad ogni probe presente sull'array sono stati processati tramite l'uso del software GeneSpring 10 (Agilent Technologies). L'analisi statistica è stata condotta utilizzando l'intensità media del segnale corretta del background ottenuta per ogni spot. I dati sono stati normalizzati usando una normalizzazione intensità dipendente- LOWESS normalization. I geni differenzialmente espressi sono stati identificati utilizzando la correzione Benjamini e Hochberg “False Discovery Rate” (p-Value < 0.05), per la riduzione dei falsi positivi. Dei geni differenzialmente espressi, solo quelli con un fold change  $\geq 2$  o  $\leq 2$ , sono stati selezionati per l'analisi di annotazione funzionale. L'analisi di raggruppamento secondo il modello gerarchico è stata condotta sui dati differenzialmente espressi (fold change  $\geq 2$  o  $\leq 2$ ; p-Value < 0.05), applicando la distanza metrica di “Pearson” e l'algoritmo “centroid”. L'annotazione funzionale delle probe differenzialmente espresse e lo studio dei geni annotati è stata condotta mediante il software Blast2go (Conesa et al., 2005) ed è stata finalizzata tramite annotazione manuale. L'annotazione funzionale è stata ottenuta in base ai database di Gene Ontology, KEGG maps, InterPro and Enzyme Codes.

## **4.4 Analisi di espressione tramite real-time RT-PCR**

### **4.4.1 Retrotrascrizione del primo filamento di cDNA**

Per la sintesi del primo filamento di cDNA è stata utilizzata la SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). A 2 µg di ogni campione di RNA DNA-free sono stati aggiunti 1 µl di oligo d(T)<sub>12-18</sub> primer (500 µg/ml), 1 µl di dNTPs mix (10 mM) ed acqua bidistillata sterile fino ad un volume di 12 µl. I campioni sono stati incubati a 65°C per 5 minuti. In seguito sono stati posti in ghiaccio e sono stati aggiunti 4 µl di 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µl 0,1 M DTT e 1 µl di Ribolock Ribonuclease Inhibitor (20 unità/µl). I campioni sono stati incubati a 42°C per 2 minuti. Infine, ad ogni campione è stato aggiunto 1 µl di enzima SuperScript II RT (200 unità) e incubati a 42°C per 50 minuti e 70°C per 15 minuti per bloccare la reazione. I campioni sono stati conservati a -20°C.

### **4.4.2 Controllo sintesi primo filamento di cDNA**

Per saggiare la qualità del cDNA sintetizzato, sono state effettuate delle amplificazione con la coppia di primer StbEF Fw (5'- AAGCTGCTGAGATGAACAAG-3') e LeEF Rv (5'- GTCAAACCAAGTAGGGCCAAA-3') disegnati sul gene *EF1-α*. I primer sono stati disegnati a cavallo di un introne, rendendo possibile la distinzione della banda di amplificazione del DNA genomico (750 bp) rispetto a quella del cDNA (650 bp). Le reazioni di amplificazione sono state allestite in un volume finale di 20 µl. Per ogni reazione sono stati impiegati 0,5 unità di Taq polimerasi (Promega), 1X Buffer (Promega), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,3 µM primer ed acqua bidistillata a volume. Per le varie reazioni di amplificazione è stato utilizzato cDNA diluito 1:20 e per ogni reazione sono stati usati come template 2µl. Il ciclo di amplificazione ha incluso una fase iniziale di denaturazione a 94°C per 5 minuti, seguita da 30 cicli composti da una fase di denaturazione (95°C per 30 secondi) una fase di annealing (54°C per 30 secondi) e una fase di elongazione (72°C per 45 secondi). Le reazioni, infine, hanno incluso una fase finale a 72°C per 9 minuti. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio (1% p/v) in Buffer 1X TAE (Sambrook et al., 1989).

### **4.4.3 Analisi Real Time PCR quantitativa**

I primers per l'amplificazione dei geni oggetto di questa analisi sono stati disegnati utilizzando il Software "Primer Express" (Applied Biosystem) (tabella 4.1). Per l'analisi di espressione tramite Real Time PCR, le reazioni sono state allestite in un volume finale di 12,5 µl. Sono stati impiegati 4 µl di cDNA diluito 1:20 ai quali sono stati aggiunti 6,25 µl di 2X QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), i due primer a concentrazione finale di 300 nM ed acqua bidistillata sterile a volume. Tutte le reazioni sono state condotte in triplicato e su tre repliche biologiche per ogni tempo. Il ciclo di amplificazione ha incluso una fase iniziale di denaturazione (95°C per 10 minuti) seguita da 40 cicli composti da una fase di denaturazione (95°C per 15 secondi) e una fase di annealing (60°C per 1 minuto). Per l'analisi è stato impiegato il termociclatore ABI PRISM 7900 HQ dell'Applied Biosystem. I dati di espressione sono stati analizzati con il software RQ manager (Applied Biosystem, CA, USA). Per il calcolo dell'indice RQ che quantifica i livelli di trascritto del gene d'interesse, è stato utilizzato il metodo del Ct comparativo in cui si è utilizzato come controllo endogeno il gene codificante per *l'elongation factor-1α* (*EF1-α*) in modo da normalizzare la



quantità di mRNA del gene target e come calibratore il campione controllo (non infestato) di ogni tempo (Livak and Schmittgen, 2001). L'analisi statistica è stata eseguita valutando se i valori medi di  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  di ogni gene target ad ogni tempo fosse significativamente differente dal valore del campione controllo (Student's *t*-test).

Tabella 4.1: Sequenze oligonucleotidiche dei primers impiegati per l'amplificazione tramite Real Time PCR

Primers	Sequenza (5' – 3')	Gene	N° accessione	L.A	Ta
EF1 fw Rt	CTCCATTGGGTCGTTTTGCT	<i>EF1-α</i>	X53043	101	60
EF1 rv Rt	GGTCACCTTGGCACCAGTTG				
P4FW	TCAGTCCGACTAGGTTGTGGTC	<i>P4</i>	BW688678	99	60
P4RW	TAAGGACGTTCTCCAACCCAG				
Nimin2c fw	GCTCAGATTGAGCCGAAAAC	<i>Nimin2c</i>	AK328844	111	60
Nimin2c rw	TCTCACGATTCCCCGTTCTCT				
AP2/ERF fw	GAAATTCGCGATTGGGCTAG	<i>AP2/ERF</i>	AK320209	104	60
AP2/ERF rw	CGCATTCTAAAAGCCGCTCT				
RLK1 fw	CGAAAATGACTCTGCCACCA	<i>RLK1</i>	TA48642_4081	104	60
RLK1 rw	ATCACGCAGTTGGAATCCG				
WRKY40 fw	CACAATCATCCCCAACCACCT	<i>WRKY40</i>	AK325041	150	60
WRKY40 rw	CGACAACGAAGACGCCATTT				
Inhl fw	GAAACTCTCATGGCACGAAAAG	<i>Inhl</i>	TA38240_4081	105	60
Inhl rw	CACCAATAAGTTCTGGCCACAT				
InhII fw	CCAAAAAGGCCAAATGCTTG	<i>InhII</i>	K03291	116	60
InhII rw	TGTGCAACACGTGGTACATCC				
PR1 fw	ATGCAACACTCTGGTGGACCTT	<i>PR1</i>	AK324158	102	60
PR1 rw	CCATTGCTTCTCATCAACCCA				
LapA fw	ATCTCAGGTTTCCTGGTGGAA	<i>LapA</i>	AK323624	200	60
LapA rw	AGTTGCTATGGCAGAGGCAGA				

Ta: temperatura di annealing; L.A.: Lunghezza amplificato in bp

## 4.5 Analisi proteomica

### 4.5.1 Estrazione proteica e analisi elettroforetica in due dimensioni

Per l'estrazione delle proteine totali, è stato utilizzato il tessuto fogliare di 3 piante infestate e 3 piante controllo. Circa due grammi di foglie congelate sono state finemente polverizzate con azoto liquido in un mortaio e risospeso in 7,5 ml di buffer di estrazione (700 mM saccarosio, 500 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM EDTA, 100 mM KCl, 2% w/v β-mercaptoetanol, 1 mM PMSF) tramite agitazione per 15 minuti e poi posto in ghiaccio. Dopo l'aggiunta di un egual volume di fenolo saturato con 500 mM Tris-HCl, pH 7.5, la miscela è stata agitata per 10 minuti e centrifugata a 10,000 rpm per 15 minuti a 4°C. Eliminato il surnatante, 5 volumi di ammonio acetato saturo in metanolo sono stati aggiunti ad ogni campione e sono stati incubati per 16 ore a -20°C. Successivamente, le proteine precipitate sono state centrifugate a 10,000 rpm, per 30 minuti. Le proteine sono state conservate a -80°C fino al loro uso. Prima del loro utilizzo, le proteine totali precipitate sono state lavate con metanolo freddo (una volta) e con acetone freddo (3 volte), asciugate e risospese nel buffer di isoelettrofocalizzazione (IEF) (9 M urea, 4% w/v CHAPS, 0.5% v/v Triton X-100, 20 mM DTT, 1% w/v IPG buffer pH 4–10- Bio-Rad). La concentrazione proteica è stata stimata con saggio colorimetrico di Bradford, utilizzando il blu di Coomassie come colorante e misurando l'assorbanza delle soluzioni proteiche a 595 nm, dopo aver costruito un'opportuna curva di calibrazione con soluzioni a titolo noto di BSA (Promega). L'isoelettrofocalizzazione (IEF) in prima dimensione è stata effettuata su

strips di Immobilized pH Gradient (IPG) (18 cm pH 4–10, Bio-Rad ReadyStrip, Bio-Rad) le quali sono state reidratate con 460  $\mu$ L di buffer IEF contenente 400  $\mu$ g di proteine totali, e incubate per 16 ore. L'isoelettrofocalizzazione è stata realizzata con il sistema Protean IEF Cell (Bio-Rad) a 12°C applicando il seguente voltaggio: 250 V (90'), 500 V (90'), 1000 V (180') and 8000 V per un totale di 52 kWh. Dopo la separazione in prima dimensione, le strips IPG sono state equilibrate per 15 minuti con un tampone di equilibratura (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% w/v glicerolo, 2% w/v SDS, blue di bromofenolo in tracce) contenente 1% w/v DTT e poi 15 minuti con 2.5% w/v di iodoacetamide. La seconda dimensione è stata realizzata in gel di poliacrilammide 12% (18x24 cmx1 mm) con il sistema Protean Apparatus (Bio-Rad), in presenza di un buffer di corsa (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.92 M glicina e 1% w/v SDS), applicando una differenza di potenziale di 120 Volt per 12 ore. Per garantire la riproducibilità, i campioni sono stati caricati in triplicato.

#### **4.5.2 Acquisizione immagine e analisi**

I gels sono stati colorati in Coomassie colloidale G-250. Le immagini relative alle corse eseguite sono state acquisite con il densitometro GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad), e analizzate mediante il programma per analisi d'immagine PD-QUEST (Bio-Rad). L'identificazione degli spot e la corrispondenza tra i diversi gel è stata eseguita automaticamente e confermata da una verifica manuale. Gli spot proteici sono stati annotati solo se presenti e identificati in tutti i gel. Dopo la normalizzazione dell'intensità di ciascun spot sulla base dell'intensità totale delle proteine presenti nel gel, la quantità percentuale di ogni spot è stata mediata per i sei differenti gel (tre replicati di due repliche biologiche). Tramite un test *t*-Student sono stati individuati i "fold changes" proteici con valori significativi tra le piante controllo e le piante infestate. Per gli studi comparativi sono stati considerati quegli spots la cui intensità subiva, da un campione all'altro, una variazione non inferiore a 2 volte.

#### **4.5.3 Digestione proteica e analisi MALDI TOF**

Le bande/spots d'interesse sono stati escisse dal gel e lavati con acqua. Le proteine presenti nelle bande/spots di acrilammide sono state ridotte con una soluzione di 10 mM DTT, 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  per 45 minuti a 55°C, e successivamente S-alchilate con una soluzione di 55 mM iodoacetamide, 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  per 30 minuti a temperatura ambiente al buio. Dopo ulteriori lavaggi in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e acetonitrile, le bande disidratate sono state reidratate con la soluzione di digestione (12.5 ng/L di tripsina in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) per 1 ora a 5°C. La soluzione in eccesso è stata rimossa e sostituita da una soluzione 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5mM  $\text{CaCl}_2$  ed incubata a 37°C overnight. Le miscele peptidiche sono state estratte in una soluzione 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /acetonitrile (1:1 v/v) tramite sonicazione e poi concentrate. I campioni sono stati desalificati mediante l'uso di pipette  $\mu$ ZipTipC18 (Millipore) prima dell'analisi MALDI-TOF-MS e/o direttamente analizzati tramite  $\mu$ LC-ESI-IT-MS/MS. Le miscele peptidiche sono state caricate sul target MALDI insieme con la matrice costituita da acido cianoidrossicinnamico (CHCA) tramite il metodo "Dried Droplet". I campioni sono stati analizzati tramite uno spettrometro di massa Voyager-DE PRO (Applera, USA). Gli spettri di massa per gli esperimenti PMF sono stati acquisiti in modalità reflectron e sono stati calibrati internamente, utilizzando i peptidi ottenuti dalla digestione della tripsina. I dati sono stati elaborati tramite l'uso del software DataExplorer 5.1 (Applera). Le miscele peptidiche sono state

ugualmente analizzate tramite lo spettrometro di massa LCQ Deca Xp Plus (ThermoFinnigan) dotato di una fonte elettrospray connessa ad una pompa Phoenix 40 (ThermoFinnigan) (Rocco et al., 2006). Le miscele sono state separate su colonna Hypersil- Keystone Aquasil C18 (100x0.32 mm, 5  $\mu$ m) applicando un gradiente lineare da 10% a 60% di acetonitrile in 0,1% di acido formico, per 60 minuti con un flusso di 5  $\mu$ l/min. Gli spettri sono stati acquisiti in un range di 200–2000 m/z. I dati sono stati elaborati tramite il software BioWorks 3.1.

#### 4.5.4 Identificazione delle proteine

Per l'identificazione degli spot ottenuti dall'analisi PMF nel database non ridondante NCBI è stato utilizzato il software ProFound (Zhang et al., 2000). Le putative proteine con un ProFound's Est'd Z scores >2 sono state ulteriormente valutate tramite confronto con i valori sperimentali di Mr e pI ottenuti dall'analisi 2-DE. Il software SEQUEST è stato impiegato per l'identificazione delle proteine analizzate tramite analisi  $\mu$ LC-ESI-IT-MS/MS (Qian et al., 2005). Le proteine candidate ottenute dal database NCBI con più di tre spettri peptidici appartenenti alla stessa proteina e con un valore di SEQUEST Xcorr >2.5 sono state ulteriormente analizzate tramite confronto con i valori sperimentali di Mr e pI ottenuti dall'analisi 2-DE. L'annotazione funzionale delle proteine identificate è stata svolta tramite il software Blast2GO (Conesa et al., 2005).

Per il confronto tra i dati trascrittomici e proteomici, è stata condotta un'analisi di similarità tra le sequenze di ogni proteina differenzialmente espressa e le sequenze di pomodoro disponibili nella banca dati Nucleotide collection (nr/nt) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) mediante l'algoritmo di allineamento locale Tblastn, col fine di verificare se ci fossero allineamenti significativi con cloni o sequenze di pomodoro. Successivamente, è stato controllato se il numero di accessione corrispondente al clone ottenuto dall'allineamento fosse presente come probe sul tomato array 4x44k, in modo da risalire alla probe corrispondente e verificare se tale probe fosse tra quelle differenzialmente espresse.

#### 4.6 Saggio di performance dell'afide

Per valutare l'effetto della presenza dell'insetto terricolo sulla performance dell'afide, *M. persicae* è stato posto su piante di pomodoro in precedenza esposte (trattamento) e non esposte (controllo) a larve di *A. lineatus*.

Prima del loro utilizzo, l'insetto terricolo *Agriotes lineatus* è stato posto per un giorno a temperatura ambiente, in modo da incrementare la sensazione di digiuno. Successivamente tre larve di *A. lineatus* sono state inoculate per ogni pianta tramite il rilascio di quest'ultime sulla superficie del terreno in prossimità del fusto. Dopo circa 10 minuti ogni pianta è stata controllata per assicurare che tutte le larve fossero penetrate nel terreno. Otto giorni dopo l'inoculo di *Agriotes*, sulla quarta foglia completamente espansa sono state trasferite delicatamente mediante l'uso di un pennello, sei ninfe primo giorno di *M. persicae*, sia per le piante controllo che trattamento. Per ottenere le ninfe primo giorno, adulti apteri di *M. persicae* sono stati trasferiti su nuove piante di pomodoro, dando loro la possibilità di riprodursi per 24 h, dopodiché le ninfe prodotte sono state utilizzate per il saggio. Un totale di 20 piante sono state impiegate per il saggio (10 piante con e 10 piante prive dell'insetto terricolo). Per tutto il tempo del saggio, ogni pianta è stata posta individualmente all'interno di gabbie di tessuto cilindriche (altezza 1 m, diametro 35 cm). Le piante

sono state distribuite casualmente all'interno delle gabbie per evitare ogni potenziale effetto di posizione sullo sviluppo dell'afide. Ventiquattro ore dopo l'inoculo, ogni singola pianta è stata controllata per garantire la sopravvivenza di ogni ninfa. In seguito, giornalmente ogni afide è stato monitorato in modo da stabilire la sua sopravvivenza e il suo sviluppo a stadio di adulto. Dal primo giorno in cui ogni individuo è divenuto adulto (prima ninfa deposta) e per i consecutivi 5 giorni, il numero di nuove ninfe prodotte giornalmente per afide è stato registrato, dopodiché ogni ninfa è stata rimossa. In seguito, mediante l'uso di un'ultramicrobilancia (MT5-XP6U; mettler toledo) sono stati determinati il peso fresco e il peso secco di ogni afide. Per la misura del peso secco, ogni singolo afide è stato essiccato ad una temperatura di 45 °C per circa 24h. Ad esperimento terminato le larve di *A. lineatus* sono state recuperate per garantire che fossero ancora vive. La biomassa delle radici e dei germogli di ogni pianta è stata determinata nel seguente modo. La parte aerea è stata separata dalle radici eseguendo un taglio sotto i cotiledoni e le radici lavate con acqua corrente in modo da allontanare ogni residuo di terreno. I campioni sono stati essiccati in forno ad una temperatura di 70 °C per circa 48h. L'analisi statistica dei dati collezionati è stata eseguita mediante il software STATISTICA 10 (StatSoft Inc). Un *t*-test è stato impiegato per determinare la significatività osservata tra i due trattamenti.

#### **4.7 Saggi biologici all'olfattometro con *Diaeretiella rapae***

Per lo studio della risposta comportamentale di *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiinae) è stato utilizzato l'olfattometro a Y per verificare la preferenza dell'insetto nei confronti di due stimoli. Tale sistema di analisi consiste nella produzione di un flusso d'aria, generato da una pompa, la cui velocità è regolata attraverso due flussimetri a 2 l/min. Tale flusso viene fatto passare attraverso un filtro a carboni attivi e in seguito per due tubi in teflon che dividono il flusso e lo collegano a due differenti fiaschi chiusi ermeticamente, in cui sono presenti le fonti di produzione dei volatili da esaminare. Da qui, infine, il flusso scorre nei due bracci dell'olfattometro. Tale sistema è illuminato dall'alto e circondato da un telo scuro, in modo da assicurare un'uniforme distribuzione della luce sul tutto sistema e ridurre fonti di disturbo esterne che potrebbero influenzare il parassitoide. Una femmina del parassitoide viene introdotta nel tubo a Y a livello del punto di rilascio, e le è dato un tempo massimo di 10 minuti per effettuare una scelta. Quando il parassitoide entra in un braccio dell'olfattometro e raggiungere la sua estremità si può asserire che ha compiuto una scelta tra le due fonti di volatili. Ogni dieci individui testati, i bracci dell'olfattometro vengono scambiati di posizione in modo da eliminare ogni influenza direzionale sul parassitoide. Il saggio comportamentale è stato condotto dando la possibilità al parassitoide di poter scegliere tra le seguenti combinazioni: piante di pomodoro infestate dall'afide *M. persicae* verso piante con l'insetto terricolo e l'afide *M. persicae* (A vs IT+A); piante di pomodoro senza l'ospite *M. persicae* (C) verso piante solo con l'insetto terricolo (IT). Per ogni combinazione sono state analizzate cinque piante (repliche biologiche) e per ogni replica sono state testate giornalmente 20 femmine del parassitoide, ognuno una sola volta, per un totale di 100 individui per ogni trattamento. Per le infestazioni, piante di quattro settimane sono state inoculate con larve di *A. lineatus* come descritto nel precedente paragrafo. In seguito, a cinque giorni dall'infestazione sono stati posti sulle foglie più giovani e più espanse circa 40 afidi (di diversa età). Ventiquattro ore dopo le piante sono state utilizzate per il

saggio. Per le piante infestate solo con l'insetto terricolo, è stato seguito lo stesso schema descritto in precedenza.

#### **4.8 Risposta molecolare della pianta di pomodoro al duplice attacco**

Per ottenere informazioni circa le risposte di difesa indotte in seguito al danno provocato dall'azione individuale o combinata degli insetti del suolo e della parte aerea, è stata condotta un'analisi molecolare su materiale vegetale raccolto da piante di pomodoro non danneggiate utilizzate come controllo, da piante infestate con l'insetto terricolo *A. lineatus*, da piante infestate con l'afide *M. persicae* e da piante infestate da *M. persicae* e *A. lineatus*. Per tanto sono state eseguite delle infestazioni mirate del materiale vegetale. Un set di piante di pomodoro 'Microtom' è stato inoculato solo con larve di *A. lineatus* come descritto nel precedente paragrafo. Per un altro set di piante, circa 20 ninfe di diversa età, dell'afide *M. persicae*, sono state trasferite su due delle foglie sub-apicali più espanse. Su un nuovo set sono state inoculate contemporaneamente le larve di *A. lineatus* e le ninfe di *M. persicae* come descritto in precedenza. Un ultimo set è stato impiegato come controllo. Dopo l'inoculo degli insetti erbivori, ogni pianta è stata posta individualmente all'interno di gabbie di tessuto cilindriche (altezza 1 m, diametro 35 cm). Le piante controllo sono state allevate nelle stesse condizioni sperimentali. Il campionamento del materiale vegetale da ogni set di piante è stato effettuato a 24h, 48h e 8 giorni dall'inoculo, mediante raccolta delle foglie adiacenti a quelle inoculate con l'afide. Il materiale vegetale è stato raccolto da cinque differenti piante appartenenti allo stesso trattamento e congelato in azoto liquido per la successiva estrazione dell'RNA totale.

## 5. RISULTATI

L'afide della patata (*Macrosiphum euphorbiae* T.) è uno degli agenti più dannosi del pomodoro coltivato (*Solanum lycopersicum*). Oltre al danno diretto, dovuto all'alimentazione, può essere spesso vettore di virus fitopatogeni. Esistono limitate informazioni circa i meccanismi molecolari che sono alla base della resistenza della pianta. Allo scopo di ottenere una dettagliata comprensione dei cambiamenti indotti in piante di pomodoro in seguito all'attacco dell'afide *M. euphorbiae*, in questo lavoro di tesi è stato condotto uno studio con approcci "omici" (analisi trascrittomiche e proteomiche). Inoltre, è stata esaminata la risposta della pianta di pomodoro quando sottoposta all'attacco di due insetti dannosi, in particolare afidi e l'insetto terricolo *A. lineatus*. Tale studio ha previsto sia una valutazione della difesa diretta ed indiretta della pianta, sia un'analisi trascrizionale per investigare quali fossero le risposte sistemiche di difesa indotte in seguito al danno provocato dall'azione individuale o combinata degli insetti del suolo e della parte aerea.

### 5.1 Identificazione dei geni attivati in seguito all'attacco dell'afide *Macrosiphum euphorbiae*

Per l'identificazione di geni differenzialmente espressi in seguito all'attacco dell'afide, è stato eseguito uno studio trascrittomico utilizzando piante di pomodoro 'MicroTom'. A tale scopo, in collaborazione con la Prof.ssa C. Digilio del Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria dell'Università di Napoli Federico II, sono state effettuate dell'infestazione controllate con il *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas). Le foglie sono state raccolte dopo 24h, 48h e 96h dall'inizio dell'infestazione da piante infestate, e come controllo, da piante non infestate. L'RNA totale è stato isolato dalle foglie di tre piante controllo e di tre piante infestate per ognuno dei tre tempi in analisi. L'analisi microarray è stata condotta presso i laboratori del CEINGE (Napoli), in collaborazione con il gruppo della Dr.ssa R. Martinelli. Per lo studio dei geni differenzialmente espressi è stata utilizzata la strategia del "Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis" (Agilent). Le tre repliche dei campioni controllo e infestati, marcati con la Cianina 3- e Cianina 5-, rispettivamente, sono stati ibridati su degli "4x44k Tomato array" su cui sono presenti 43,803 probe corrispondenti 22100 sequenze EST di pomodoro.

Prima di effettuare lo studio dei livelli di espressione, è stata condotta un'analisi delle componenti principali sulla varianza dei dati relativamente ai singoli array. Tale analisi preliminare è un controllo della qualità dei campioni. In figura 5.1 sono riportati in grafico i valori delle prime tre componenti principali per ogni array. Ogni punto rappresenta un array e ogni colore rappresenta un tempo di infestazione. Mediante questa analisi è possibile osservare la separazione tra i gruppi di replicati appartenenti ad ogni tempo di infestazione (24h, 48h e 96h) che raggruppano insieme e separatamente dalle repliche degli altri tempi.

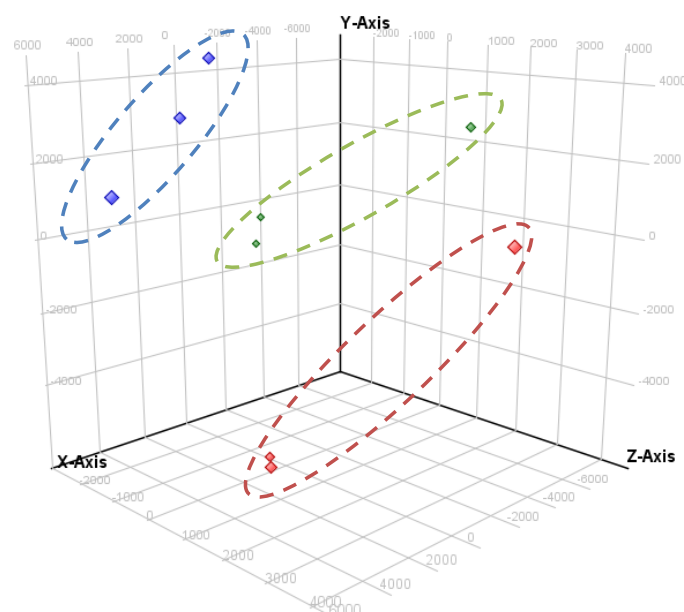


Figura 5.1: Analisi delle componenti principali delle tre repliche degli array per ogni tempo di infestazione. La varianza dei dati nei singoli array spiegata dalle tre prime componenti principali è dell'85,42% (PC1: 36,07%; PC2: 31,47%; PC3: 18,31%). In rosso sono riportate le tre repliche biologiche del tempo 24h; in blu le tre repliche biologiche del tempo 48h; in verde le tre repliche biologiche del tempo 96h.

Dall'analisi *t*-test ( $p < 0,05$ ) dei dati normalizzati e filtrati (fold change  $\leq$  e  $\geq 2$ ) è risultato che il 2,3% delle probe rappresentate sul chip mostrava un profilo di espressione alterato. Un totale di 999 probe sono risultate differenzialmente espresse nelle piante infestate in almeno uno dei tre tempi di raccolta (tabella 5.1). Eliminando quelle probe che corrispondevano allo stessa accessione in Gene bank si ottiene un totale di 899 geni differenti. Di questi, circa il 50% sono sovraespressi in risposta all'attacco dell'afide.

Tabella 5.1: Numero delle probe differenzialmente espresse in pomodoro in risposta all'attacco di *Macrosiphum euphorbiae* ad ogni tempo di raccolta.

Tempo di raccolta	Numeri di probe		
	up regolati	down regolati	totale
24h	87	95	182
48h	391	377	768
96h	23	26	49

Da questi dati si evince che il numero di geni coinvolti nella risposta della pianta all'attacco dell'afide aumenta significativamente da 24h a 48h. In particolare, il numero di probe deregolate a 48h è 4 volte maggiore rispetto al tempo 24h e 15 volte più alto rispetto al tempo 96h, suggerendo l'attivazione di una risposta dinamica e crescente della pianta nelle prime fasi di attacco per poi assistere ad una attenuazione della risposta nell'ultimo time-point analizzato (tabella 5.1). Le repliche per ognuno dei tre tempi ed i geni differenzialmente espressi sono stati raggruppati secondo un'analisi gerarchica, come mostrato in figura 5.2. Il *clustering* gerarchico, visualizzato mediante una rappresentazione ad albero (dendrogramma) indica, come atteso, che le tre repliche biologiche di ogni tempo di infestazione sono più strettamente correlate tra loro e raggruppano assieme. Inoltre, è possibile osservare che per il tempo 96h il profilo di espressione ottenuto si avvicina più a quello del tempo 24h che a quello a 48h. L'analisi cluster, inoltre, evidenzia la notevole

dinamicità dell'espressione genica in seguito all'attacco afidico, in quanto uno stesso cluster di geni ha una comportamento diverso nei tre tempi di infestazione, e cluster diversi hanno una andamento differente nel corso del tempo.

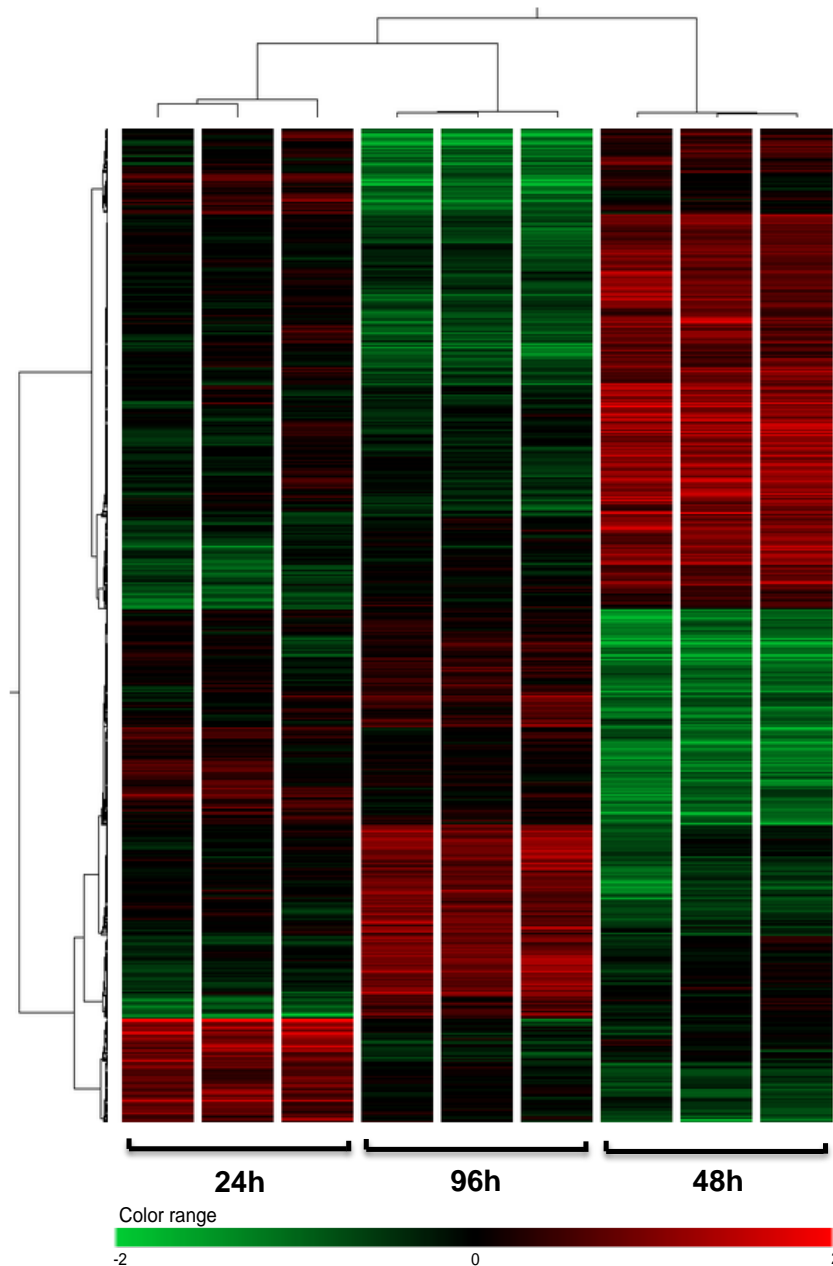


Figura 5.2: Rappresentazione ad albero (dendrogramma) del *clustering* gerarchico dei dati microarray. Tutti i geni differenzialmente espressi sono stati raggruppati in gruppi di geni similmente regolati (dimensione verticale) e le condizioni sono state raggruppate in base alla similarità dei loro profili di espressione (dimensione orizzontale).

Per l'identificazione delle sequenze comuni sono stati elaborati, sulla base dei Genbank Accession, i diagrammi di Venn ed è emerso che dei geni up-regolati (rispetto a quelli down) 2 geni (rispetto a 0) sono comuni nel time-course oggetto di studio (figura 5.3).



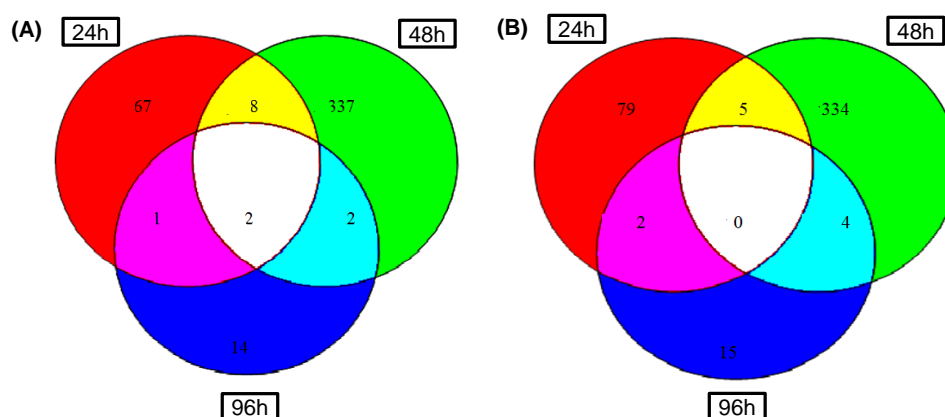


Figura 5.3: Diagrammi di Venn ottenuti dall'intersezione tra i geni up (A) e down (B) regolati nei tre tempi (24h-48h-96h).

I due geni comuni ai tre tempi, corrispondono a sequenze codificanti per due fattori di trascrizione WRKY (tabella 5.2). Come è possibile osservare dalla tabella i livelli di espressione di tali geni mostrano un andamento crescente dopo 24h indicando la presenza di un meccanismo di regolazione trascrizionale che inizia molto probabilmente nelle prime fasi di attacco della pianta per poi raggiungere maggiore intensità dopo 48h e rientrare nell'ultime fasi.

Tabella 5.2: Geni comuni identificati nei tre tempi in risposta all'infestazione con l'afide *M. euphorbiae*

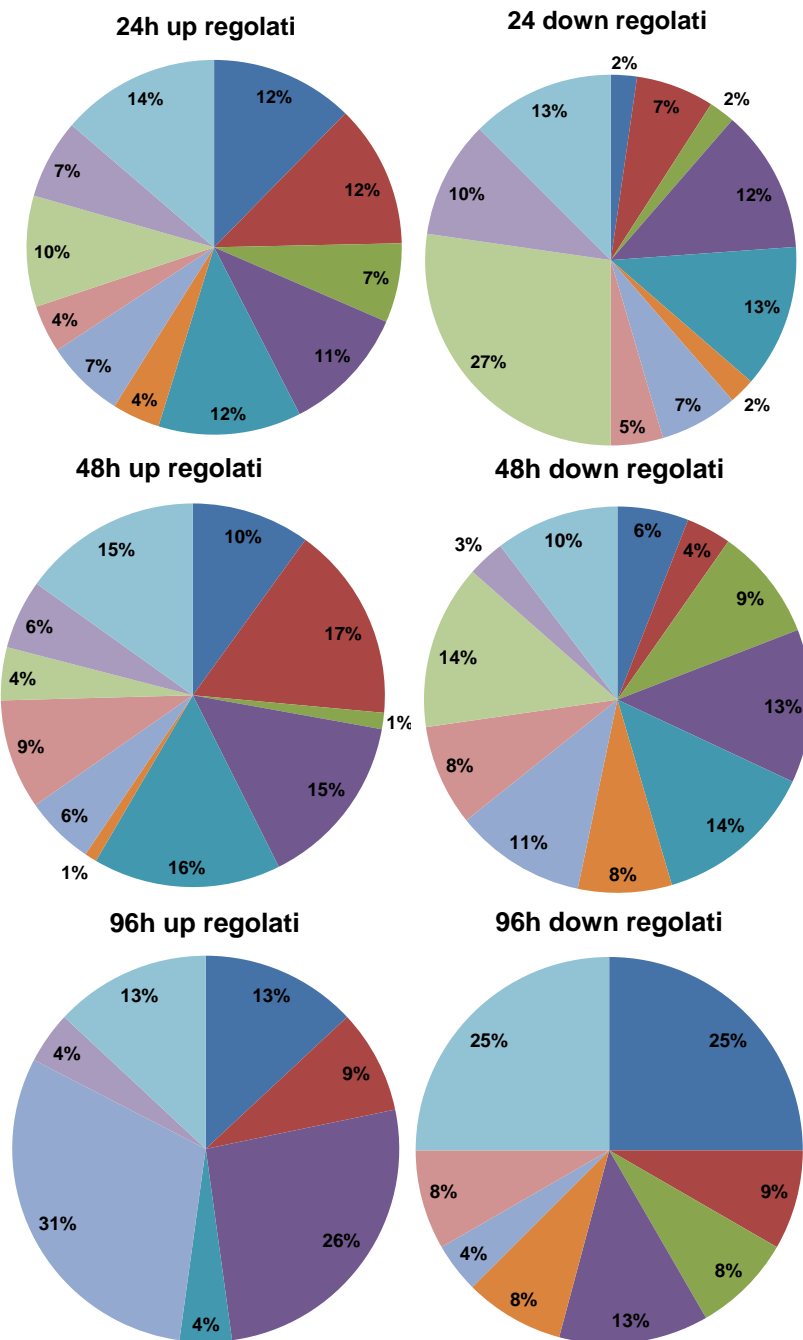
Fold change			N° accessione	Descrizione	Annotazione Blast2go
24h	48h	96h			
3,5	8,5	3,6	AK322575	WRKY TF 6	P:regulation of transcription; F:transcription factor activity; C:transcription factor complex
10,7	124,6	31,7	AK325041	WRKY TF 40	P:regulation of transcription; F:transcription factor activity; C:transcription factor complex

## 5.2 Identificazione delle classi funzionali

I geni differenzialmente espressi sono stati annotati funzionalmente con il software Blast2GO, il quale effettua tre principali passaggi: un allineamento di similarità con sequenze disponibili nella banca dati NCBI, una fase di *mapping* in cui per ogni "hit" ottenuta dall'analisi blast sono recuperati i *GO term* secondo il consorzio di Gene Ontology (GO) e una fase di annotazione in cui sono assegnate le diverse categorie funzionali. Per quelle sequenze che il programma non è stato in grado di individuare similarità significative, l'analisi bioinformatica è stata finalizzata tramite una annotazione manuale. Dopo la revisione manuale delle annotazioni, il 5% e 9% delle sequenze, per i tempi 24h e 48h rispettivamente, non hanno fornito "match" con sequenze note presenti nelle banche dati considerando i parametri del programma (Conesa et al., 2005).

Nel caso in cui i geni sono coinvolti in più processi metabolici, essi sono stati classificati tenendo conto del loro ruolo principale nel metabolismo della pianta. La classificazione funzionale ha messo in evidenza come i cambiamenti trascrizionali indotti dall'attacco dell'afide coprono un ampio range di processi biologici, e le categorie funzionali identificate includono: mantenimento cellulare, trascrizione, modificazione della parete cellulare, stress e risposte di difesa, trasduzione del

segnale, fotosintesi, metabolismo primario, metabolismo proteico, metabolismo secondario e trasporto nonché funzioni sconosciute. Le maggiori differenze nei livelli dei trascritti nei tre time-point oggetto di studio riguardano le risposte di difesa e agli stress, la trasduzione del segnale e la regolazione trascrizionale. Dai grafici a torta (figura 5.4) è possibile osservare come dopo 24h dall'infestazione, il numero di geni up regolati coinvolto nelle risposte di difesa e agli stress incrementa dall'11% al 15% del tempo 48h. Inoltre anche nell'ultimo time point oggetto di questo studio (96h) la percentuale di geni putativamente coinvolti nel meccanismo di difesa della pianta è maggiore rispetto a quelli dei downregolati.



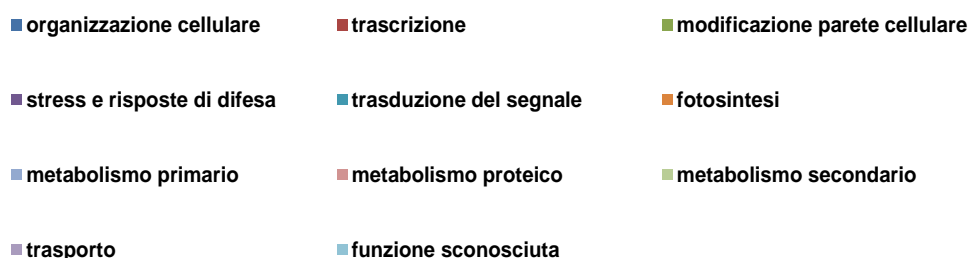


Figura 5.4: Classificazione funzionale, in base al processo biologico, dei geni up e down regolati in risposta all'attacco dell'afide *Macrosiphum euphorbiae*. Le percentuali indicano la proporzione del numero di geni in ogni categoria sul numero totale di geni differenzialmente espressi ad ogni tempo di raccolta.

Un simile andamento si osserva anche per un altro processo biologico, la regolazione della trascrizione, con il 12% e 16% dei geni upregolati rispetto al 7% e 4% dei geni down per i due tempi di infestazione, 24h e 48h, rispettivamente. Si ha un netto incremento, anche, nell'attivazione dei geni coinvolti nella trasduzione del segnale con il 4% in più di geni up regolati per il tempo di infestazione 48h.

Come è possibile osservare dai grafici, si ha un andamento opposto per i geni putativamente coinvolti nel processo fotosintetico e nel metabolismo primario della pianta. Con il progredire dell'infestazione afidica, si ha una crescita percentuale dei geni down-regolati rispetto quelli up regolati che subiscono invece una diminuzione. Un simile andamento si riscontra anche per i processi biologici quali la modificazione della parete cellulare (dal 7% al 1% per gli up e dal 2% all'9% -8% per i down), organizzazione cellulare (dal 12% al 10% per gli up e dal 2% all'6% per i down). Dall'altro lato, per i geni classificati come putativamente coinvolti nel metabolismo secondario della pianta per entrambi i primi due tempi di induzione si ha una maggiore percentuale dei geni down regolati rispetto a quelli up.

## 5.3 Classificazione funzionale dei geni differenzialmente espressi

### 5.3.1 Geni correlati alle risposte di difesa

In seguito all'attacco dell'afide, si osserva la regolazione di geni putativamente coinvolti nella biosintesi di molecole di difesa (Appendice: tabella A.1, A.2, A.3). Sono stati raggruppati in questa categoria quei geni che dall'annotazione funzionale risultavano essere coinvolti nelle risposte agli stress ossidativi, agli stress di tipo biotico e abiotico e risposte di difesa. Un totale di 112 geni implicati nelle risposte a stress di tipo biotico e abiotico sono differenzialmente espressi a 24h, 48h e 96h dall'infestazione.

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono tra le prime molecole segnale ad essere prodotte dalla cellula in seguito al riconoscimento di elicitori rilasciati dall'insetto/patogeno o prodotti in seguito al danno inferto durante la fase di penetrazione ed sono in grado di coordinare e attivare le risposte di difesa della pianta a stress sia di tipo biotico che abiotico. Nei tre tempi oggetto di studio, un totale di 19 geni coinvolti sia nel metabolismo delle specie reattive dell'ossigeno sia nella risposta agli stress ossidativi sono differenzialmente espressi in risposta all'attacco del *M. euphorbiae*, suggerendo che lo stato redox delle cellule viene alterato (Appendice: tabella A.1, A.2, A.3). In particolare, 17 di questi geni sono indotti dopo 48h, mentre a 24h e 96h solo un gene per ogni tempo risulta essere downregolato. Tra i principali geni coinvolti nella produzione dei ROS, risulta essere indotto il gene *Respiratory Burst Oxidase Homolog Protein D* (RBOHD), che codifica per una subunità del complesso NADPH oxidase, enzima chiave coinvolto nella

produzione di  $H_2O_2$ . Come è noto tale composto reattivo che funge da importante segnale nelle difese della pianta e nelle risposte da ferita determinando l'induzione dei geni di difesa non solo a livello locale ma anche distale (Miller et al., 2009). Dall'altro lato la pianta si difende da questo "burst" ossidativo mediante l'attivazione di geni quali *Glutaredoxine*, *Glutathione-S-transferasi* e *Peroxidase* codificanti per enzimi in grado di ridurre i livelli di perossido di idrogeno presenti in eccesso nella cellula, detossificare le molecole riducenti e svolgere un'azione di difesa contro i patogeni e gli insetti erbivori. In particolare le perossidasi sono la classe di geni coinvolti nella risposta agli stress ossidativi, che mostra un livello di espressione più alto che va da 2 a 6 volte. Lo stress ossidativo derivante principalmente dall'accumulo eccessivo delle specie reattive dell'ossigeno, può causare l'ossidazione dei lipidi di membrana con conseguente produzioni di prodotti di degradazione tossici per la cellula quali, l'aldeidi. Dopo 48h dall'induzione afidica, la pianta regola l'attività di geni quali *Aldeide deidrogenase* e *Aldo-keto reductasi*, che partecipano al meccanismo di detossificazione, limitando l'accumulo dell'aldeidi reattive e di conseguenza lo stress ossidativo. Un altro gene upregolato a 48h è *Alpha-dioxygenase 2*, enzima che agisce a livello degli acidi grassi determinando la formazione di molecole quali le oxilipine che possono fungere sia da molecole segnale sia da agenti protettivi per la cellula contro i danni ossidativi (Tirajoh et al., 2005). Tra i geni downregolati sia a 24h che 48h, rientranti in tale categoria funzionale, vi sono i *Temperature-induced lipocalin* e *Chloroplast lipocalin*, codificanti per proteine di piccole dimensioni coinvolte nella risposta a diversi fattori di stress, tra cui elevate o basse temperature.

Diversi geni coinvolti nella sintesi di molecole segnale di risposta a stress quali, l'acido salicilico (6 geni), l'acido giasmonico (1 gene) e l'etilene (3 geni) sono differenzialmente espressi, dopo attacco dell'afide *M. euphorbiae*. A 48h ore si osserva la down regolazione di geni coinvolti nella sintesi sia dell'acido giasmonico, quali il gene *lipoxygenase (loxD)*, che dell'acido salicilico, *phenylalanine ammonia-lyase*, così come a 24h il gene *SAMT: salicylic acid carboxyl methyltransferase* è sottoespresso. Sempre a 24h, il gene *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* risulta essere down regolato, mentre si osserva una forte induzione di tale gene a 48h. Tale gene codifica per un enzima ACC ossidasi coinvolto nella biosintesi dell'etilene. Un ampio range di geni di risposta all'acido salicilico (37 geni) e all'acido giasmonico (12 geni) sono up e down regolati nei tre tempi di infestazione. Geni di risposta all'acido salicilico quali le proteine PR, *P4*, *PR1*, *PR6*, *Class I Chitinase* e *Nimin2c* sono fortemente upregolati a 48h. In particolare il gene *Nimin2c*, mostra i livelli di espressione maggiore e resta indotto fino a 96h dopo l'attacco da parte dell'afide. Il gene *Nimin2c* codifica per una proteina che interagisce con NPR1 e regola l'espressione delle proteine PR in particolare PR1 (Zwicker et al., 2007). Inoltre sia a 24h che 96h sono indotti i geni *Acidic endochitinase* e *Acidic endochitinase III*, *Class II Chitinase*, una famiglia genica presente in pianta, espressa in modo inducibile come proteine PR e costitutivamente nei tessuti vulnerabili all'attacco dei patogeni (Samac et al., 1990; Collinge et al., 1993). Dopo 48h, invece, risulta downregolato un'altro gene codificante per una proteina PR, *Subtilisin-like protease*. Un ulteriore gene deregolato è *Ankyrin repeat protein*, che a 24h risulta down regolato, mentre a 48h up regolato. È noto che tali geni svolgono un ruolo di attivatori nelle risposte contro agenti patogeni e sono in grado di regolare le risposte di difesa dipendenti dall'acido salicilico, tra cui la SAR (Dong, 2004; Lu et al., 2003). Diversi geni correlati alla patogenesi risultano downregolati a 48h, quali *Pto-responsive gene 1 protein*, *Acid phosphatase*, *Disease resistance response protein*,

*Putative germin-like protein* e *Hydroxyproline-rich glycoprotein*. Diverse geni *prolin-rich protein* risultano, invece, up e down regolati sia a 24h che 48h, in particolare si osserva sia una forte un'induzione che repressione di tali geni a 48h. E' noto che la formazione di cross link tra tali proteine determina un rafforzamento della parte cellulare contribuendo alle risposte di difesa della pianta. Diversamente dai geni correlati all'acido salicilico, molti dei geni dipendenti dall'acido giasmonico o dalle risposte a ferita, che possono svolgere un ruolo importante nelle risposte di difesa diretta della pianta, agendo come molecole tossiche o antinutritive per l'insetto sono down regolate dopo attacco dell'afide, quali ad esempio i geni *MLO1*, *Polyphenol oxidase (PPO)*, *Threonine deaminase*, *Type I serine protease inhibitor*, *Proteinase inhibitor I4-serpin* e *Serine carboxypeptidase i precursor-like protein* che risultano sottoespressi a 24h e 48h, rispettivamente. Dall'altro lato a 24h si osserva l'espressione di due inibitori di proteasi, *Wound-induced proteinase inhibitor 2* e *Trypsin protease inhibitor family protein* mentre a 48h è fortemente indotta *Wound-induced proteinase inhibitor 1*.

Geni putativamente coinvolti nelle risposte di difesa a stress di tipo abiotico sono differenzialmente regolati in risposta all'infestazione afidica, quali diversi geni *Heat Shock Protein* che mostrano un livello di espressione down regolato sia 24h che 48h. Inoltre, due geni codificanti per due *Metallothionein-like protein* entrambi deregolati a 24h e 96h. Inoltre, sono stati identificati anche geni implicati nelle risposte di difesa agli stress idrici, tra cui il gene *Dehydrin*, sottoespresso a 24h. L'accumulo del prodotto di tale gene si osserva non solo in conseguenza di uno stress idrico ma anche in seguito a trattamenti esogeni con l'acido abscissico (Borovskii et al., 2002). Infine, geni notoriamente coinvolti nella risposta di difesa delle piante a stress batterici e microbici, quali *E3 ubiquitin-protein ligase XB3*, *Snakin1*, *Major latex-like protein*, sono downregolati in risposta all'attacco dell'afide *M.euphorbiae*. In breve, l'attacco afidico altera l'espressione del 13% dei geni coinvolti nella difesa contro stress.

### 5.3.2 Geni correlati alla trasduzione del segnale

Un totale di 110 geni correlati alla trasduzione del segnale sono differenzialmente regolati nelle piante infestate con *M. euphorbiae* rispetto alla piante controllo nei tre tempi dall'infestazione (Appendice: tabella A.1, A.2, A.3). Il numero di geni rientranti in questa categoria costituisce la terza categoria funzionale più numerosa, dopo quella delle risposte di difesa e agli stress. È noto che il perossido di idrogeno può attivare quella cascata di fosforilazioni, che porta all'attivazione delle proteine MAP-chinasi che sono traslocate nel nucleo determinando l'attivazione di fattori di trascrizione associati a geni di difesa. L'espressione di diversi geni codificanti per tali proteine (*MAP protein kinase*, *MAP3K delta-1 protein kinase*, *MAPKK*) sono positivamente e negativamente influenzati a 48h suggerendo una specifica alterazione di vie di trasduzione del segnale in risposta all'attacco di *M. euphorbiae*. Inoltre, è stato riportato che in seguito al danno provocato dall'inserzione dello stiletto nella cellula si ha un incremento dei livelli di calcio citosolico, il quale può fungere da messaggero secondario nella trasduzione del segnale che si genera in seguito allo stress provocato dall'afide (Maffei et al., 2007). A 24h dall'attacco non si osserva un'induzione di geni che codificano per proteine di legame al calcio, ma piuttosto una loro sottoespressione. Infatti, due geni (*Calcium binding protein* e *Calcium-binding ef hand family protein*) sono entrambi downregolati. Dall'altro lato a 48h dall'infestazione, i trascritti *Calcium dependent protein kinase*, *Calmodulin-like*

*protein 41 Calcium-binding EF-hand, Calmodulin-binding protein* sono up e downregolati.

L'afide determina in pianta l'alterazione di diversi geni codificanti per recettori chinasici, come *Lectin protein kinase family protein*, fortemente indotto a 48h, un recettore in grado di legare oligosaccaridi derivanti dalla rottura della parete cellulare, che durante la penetrazione dello stiletto che fungono da elicitatori delle risposte di difesa (Murdock e Shade, 2002). A 48h diversi geni *NBS-LRR resistance protein* e *TIR-NBS-LRR resistance protein* risultano differenzialmente espressi ed una simile risposta si osserva anche per i seguenti geni, *CBL-interacting serine/threonine-protein kinase*, *Serine/threonine-protein kinase*, *LRR receptor protein kinase, putative*. I geni LRR funzionano come geni di resistenza in risposta ad agenti patogeni, nematodi e insetti fitomizi (Meyers et al., 2003; Kaloshian, 2004). Per i primi due tempi, inoltre, si osserva l'induzione di altre proteine recettoriali, in particolare due geni *Receptor-like protein kinase* sono indotti sia a 24h che 48h. Tali recettori sono codificati da una famiglia multigenica e possono essere implicati in una vasta gamma di vie di trasduzione del segnale. A 48h trascritti associati ai pathway di segnali regolati dall'etilene, *Ethylene receptor homolog (ETR5)* e *Ethylene-inducing xylanase receptor 1 (EIX 1)*, mostrano un livello di regolazione pari a 2 e 3 volte rispettivamente. Inoltre, a 48h sono up regolati i geni *Shaggy-like kinase 59* e *Shaggy-like protein kinase* codificanti per recettori coinvolti nella trasduzione del segnale dei brassinosteroidi mentre sono downregolati trascritti associati ai pathway dell'acido abscissico, quali *Protein phosphatase 2c* e *Phosphatidylinositol-4-phosphate5-kinase protein (PIP5K1)*, e dell'auxine, *Auxin-regulated protein* e *Auxin-responsive family protein*, ormoni che possono essere implicati nelle risposte di difesa della pianta. A 24h risulta fortemente down regolato il gene *RelA-Spot like protein RSH1*, gene che può regolare una rapida risposta della pianta ad agenti patogeni e altri tipi stress e che si può accumulare in foglia in seguito ad induzione con acido salicilico, metil-giasmonato, ferita e perossido di idrogeno (Kim et al., 2009).

### 5.3.3 Geni correlati alla regolazione trascrizionale

Un totale di 79 geni sono stati annotati come putativamente coinvolti nella regolazione dell'espressione genica (tabella A.1, A.2, A.3). L'infestazione delle piante di pomodoro con *M. euphorbiae* determina l'induzione di geni codificanti per fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia WRKY. I fattori di trascrizione WRKY sono importanti regolatori delle risposte di difesa dipendenti dall'acido salicilico (Maleck et al., 2000; Wang et al., 2006). In tutti e tre i tempi oggetto di studio il gene *WRKY transcription factor 40* è fortemente indotto, con il più alto livello di espressione dopo 48h. Tale fattore di trascrizione è associato alla resistenza ad agenti patogeni (Xu et al., 2006). Ulteriore gene upregolato nei tre tempi è il *WRKY transcription factor 6*, gene attivato nelle foglie senescenti e in risposta ad infezioni fungine (Robatzek et al., 2002). A 24h risulta upregolato anche il gene *WRKY transcription factor 30*, la cui funzione ancora non è stata ben chiarita, mentre a 48h è upregolato il gene *WRKY transcription factor 3*, i cui trascritti si accumulano in risposta a ferita (Skibbe et al., 2008). Ulteriori fattori di trascrizione coinvolti nelle risposte di difesa che sono attivati in risposta all'attacco dell'afide sono i fattori di trascrizione AP2, membri della sotto famiglia dei fattori di trascrizione che rispondono all'etilene (ERF), ed è stato osservato che molti geni appartenenti a questa famiglia sono regolati da una varietà di stress, come il wounding, acido giasmonico, etilene, acido salicilico o l'infezione di

differenti tipi di patogeni (Gutterson et al., 2004). I geni codificanti per tali fattori sono indotti fin dalle prime fasi di attacco, infatti a 24h si osserva l'espressione del gene *AP2/ERF domain-containing transcription factor* il cui livello di espressione incrementa a 48h. Inoltre, a 24h il gene *bHLH transcription factor* è sovraespresso rispetto alle piante controllo. Alcune evidenze mostrano che tali fattori di trascrizione in pomodoro e *Arabidopsis* intervengono nell'attivazione dei geni di difesa indotti dall'acido jasmonico (Boter et al., 2004). Ancora a 24h, il gene *bZIP transcription factor* risulta sottoespresso mentre si osserva una sua induzione a 48h insieme con il gene *Dof-type zinc-finger domain-containing protein*. Entrambi codificano per fattori di trascrizione la cui espressione è regolata in risposta a segnali di stress quali auxine, acido salicilico e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sempre a 48h sono indotti altri fattori di trascrizione appartenenti alla *Zinc finger family protein* che sono implicati nella regolazione di importanti processi biologici della pianta tra cui le risposte di difesa ad agenti patogeni (Takatsuji, 1998). Al tempo di infestazione 48h risulta up regolato, il gene *Nac domain protein* che codifica per una proteina con attività di fattore di trascrizione che sembra essere coinvolto in un ampio range di risposte a stress di tipo biotico e abiotico (Hegedus et al., 2003). A 96h risulta fortemente down regolato anche il gene codificante per *SANT/MYB domain protein*. I fattori di trascrizione appartenenti alla superfamiglia MYB sono stati associati ai processi di sviluppo così come alle risposte di difesa e stress della pianta (Yanhui et al., 2006). Inoltre, a 48h l'afide induce l'espressione di diversi geni *Pentatricopeptide repeat-containing protein* con un livello di induzione che va da 2 a 6 volte. Tali geni codificano per proteine che intervengono in quasi tutti gli step dell'espressione genica, quali la trascrizione, splicing, processing, editing e traduzione (Saha et al., 2007).

### 5.3.4 Geni correlati alla modificazione della parete cellulare

Dopo l'attacco di *M. euphorbiae*, la pianta risponde modulando l'espressione di geni che codificano per proteine coinvolte nel metabolismo e rimodellamento della parete cellulare, con un totale di 43 geni differenzialmente espressi nei tre time point oggetto di studio (Appendice: tabella A.1, A.2, A.3). Gli stress biotici, quali l'attacco di agenti patogeni e di insetti erbivori inducono l'espressione di geni che codificano per enzimi/proteine coinvolte nel rafforzamento della parete cellulare, che rappresenta un'importante barriera esterna contro la loro invasione, mediante l'alterazione della composizione chimica della parete (pectine, cellulosa) e la formazione di *cross-link*. Inoltre, l'induzione di geni associati con la modificazione della parete cellulare è stata ottenuta anche dopo attacco dell'afide (Park et al., 2006, Gutsche et al., 2009, Kusnierczyk et al., 2008), indicando un coinvolgimento di tale processo di modificazione nelle risposte di difesa della pianta contro gli afidi.

A 24h dall'attacco di *M. euphorbiae*, risultano differenzialmente espressi i geni *Cellulose synthase-like protein CslG* e *Cellulose synthase-like C5* che svolgono un importante ruolo nella sintesi della cellulosa. Risultano indotti, inoltre, il gene *Polygalacturonase, putative*, in grado di degradare i composti poligalatturonici che rappresentano la componente carboidratica della pectina costituente della parete cellulare, e il gene *Kinesin motor family protein*, essenziale durante il processo di deposizione delle microfibrille di cellulosa e per il rafforzamento della parete cellulare. Molti dei geni coinvolti nel processo di modificazione/degradazione della parete cellulare risultano down regolati a 48h, quali ad esempio geni coinvolti nella modificazione della pectina (*Pectinesterase*, *Pectin methylesterase-like protein*, dell'emicellulosa, *Xyloglucan endotransglucosylase hydrolase protein 1*), dei glucani

(*Endo-1,4-beta-glucanase*, *Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 5*), e nell'espansione della matrice cellulosa (*Beta-expansin allergen protein*, *Expansin* e *Extensin class I*). Il gene *Extensin class I* risulta sottoespresso anche dopo 96h. A differenza del primo tempo di induzione, dopo 48h si ha una repressione dei geni *Polygalacturonase-1 non-catalytic subunit beta* e *Kinesin like protein*. Diversi trascritti di *Arabinogalactan-protein* risultano invece differenzialmente regolati. Tali proteine di parete potrebbero svolgere un ruolo nel ridurre il numero di *cross link* a livello della struttura della pectina con conseguente aumento della porosità di parete e facilità di penetrazione dello stiletto dell'afide (Lampert et al., 2005).

### 5.3.5 Geni correlati alla fotosintesi e al metabolismo primario della pianta

L'attacco dell'afide determina l'alterazione di geni coinvolti nel processo di fotosintesi, nel metabolismo primario della pianta, con un totale di 41 e 77 geni up e down regolati per ogni processo (tabella A.1, A.2, A.3).

La sottoespressione di trascritti codificanti per proteine coinvolte nel meccanismo fotosintetico in seguito all'attacco di insetti o agenti patogeni, danno da ferita è stata descritta in diversi sistemi (discusso in Bilgin et al., 2010). In accordo con queste osservazioni, nei tre tempi di infestazione è stata osservata una down regolazione di geni putativamente coinvolti nel processo fotosintetico. Le maggiori differenze si osservano principalmente dopo 48h, con un numero di geni deregolati più elevato. In particolare a 24h risultano downregolati i geni *Blue copper protein* e *Photosystem I light harvesting complex gene*, mentre sono upregolati i geni *Cytochrome b6 f complex subunit v* e *Photosystem i assembly protein ycf3*. Tuttavia dopo 48h, sia il gene *Cytochrome b6 f complex subunit* che geni codificanti per proteine che costituiscono il complesso del fotosistema I e II, quali *Chloroplast oxygen-evolving protein 16 kda subunit*, *Photosystem I reaction center subunit IV A*, *Chloroplastic, Photosystem II oxygen-evolving complex protein 3*, *Oxygen evolving enhancer protein 3*, *Photosystem ii reaction center w chloroplast* risultano sottoespressi. Inoltre si osserva una sottoespressione di trascritti quali *Plastocyanin-like domain-containing protein* e *Plastoquinol-plastocyanin reductase, putative* i quali codificano per proteine che entrano in gioco nel meccanismo di trasporto degli elettroni durante il processo fotosintetico. Si osserva anche la down regolazione del gene *Ribulose biphosphate carboxylase* e di diversi geni codificanti per *Chlorophyll A/B binding protein*, *Protochlorophyllide reductase precursor* e *Thylakoid lumenal 20 kda protein*, *Thylakoid membrane phosphoprotein 14 chloroplast*. A 96h, i geni *Photosystem II protein I* e *Photosystem II reaction center protein K* risultano ancora sottoespressi.

In seguito all'attacco di *M. euphorbiae*, la pianta risponde anche mediante una regolazione del proprio metabolismo primario. Sono stati classificati in questa categoria geni che codificano per proteine putativamente coinvolte nel metabolismo dei carboidrati e dei lipidi. Con il progredire del tempo di infestazione, da 24h a 48h, si osserva un aumento del numero di geni differenzialmente espressi, mentre si ha una netta diminuzione del numero di geni deregolati a 96h dall'attacco. Per ciò che concerne il metabolismo dei carboidrati, a 24h si osserva la downregolazione dei geni *Phosphoenolpyruvate carboxylase*, *Glucosyl transferase* e *Nad-dependent epimerase dehydratase*. A 48h, 22 geni rientrati in questa categoria sono differenzialmente espressi, di cui otto geni up regolati, tra i quali *UDP-galactose 4-epimerase-like protein*, *UDP-arabinose 4-epimerase 1*, *Beta-fructofuranosidase* che sono coinvolti nel catabolismo degli zuccheri, i geni *Beta-amylase PCT-BMYI*, che agiscono durante il processo di degradazione dell'amido e il metabolismo del



maltosio nei cloroplasti, e *Phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase family protein* che codifica per un enzima coinvolto nel processo glicolitico. L'up regolazione di questi geni potrebbe rispecchiare la formazione di un nuovo punto "sink" all'interno della pianta, rappresentato dall'afide, con conseguente alterazione della distribuzione di carbonio nella pianta. Infatti si osserva anche l'up regolazione del gene *Carbohydrate transporter/ sugar porter/ transporter*. Tuttavia la pianta risponde anche mediante una sottoespressione di geni coinvolti nel metabolismo degli zuccheri mediante la downregolazione di 14 geni, quali ad esempio *Glucose phosphomutase*, che partecipa sia nel metabolismo che catabolismo del glucosio, *Beta-galactosidase*, *Beta-glucosidase*, *Sucrose synthase*, *Alpha-xylosidase precursor* e *Glucan water dikinase*, che codificano per enzimi che agiscono a livello dei polisaccaridi, *Succinate dehydrogenase subunit 3* coinvolto nel ciclo di Krebs. Un simile andamento è seguito anche dai geni coinvolti nel metabolismo lipidico, in quanto si osserva una forte down regolazione di questi geni, soprattutto dopo 48h. Tuttavia, tra i geni up regolati si ritrovano *Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein* e *Lipase class, family protein* e *GDSL-motif lipase/hydrolase family protein* coinvolti nel metabolismo dei fosfolipidi e degli acidi grassi e il gene *Sterol delta-7 reductase*, a 48h, che codifica per un enzima che catalizza lo step finale nel processo di sintesi degli steroli precursori degli ormoni brassinosteroidi in pianta (Souter et al., 2002). Oltre all'alterazioni ottenute a livello del metabolismo primario della pianta, si osserva un forte cambiamento anche a livello di geni coinvolti nel metabolismo proteico. Tali modificazioni sono limitate a 24h, ma subiscono un netto incremento a 48h, mentre non si osserva nessun gene deregolato coinvolto in tale processo a 96h. In seguito all'attacco dell'afide, diversi geni coinvolti nel processo di traduzione, di folding proteico, nel processo di modificazione post-traduzionale così come nel turn over proteico, risultano up e down regolati. Inoltre, diversi geni che codificano per proteine coinvolte nel metabolismo degli aminoacidi sono down regolati, e il gene *Putative urease accessory protein D*, e diversi geni codificanti per proteasi, quali *Aspartic-type endopeptidase/peptidase*, *Metalloendopeptidase*, *Serine endopeptidase*, *Aspartic proteinase nepenthesin-2* sono indotti in seguito all'infestazione con *M. euphorbiae*.

### 5.3.6 Geni correlati al metabolismo secondario della pianta

Oltre ad agire a livello del proprio metabolismo primario, la pianta risponde all'attacco dell'afide mediante alterazione del proprio metabolismo secondario. Il metabolismo secondario porta alla produzioni di molecole, metaboliti che non sono ritenute essenziali per la crescita della pianta ma che possono intervenire, ad esempio, come molecole segnale, molecole di difesa contro gli insetti erbivori o svolgere altre funzioni. A 48h, 56 geni contro i 29 del tempo 24h, sono up e down regolati, mentre a 96h solo due geni risultano entrambi down regolati (Appendice: tabella A.1, A.2, A.3). A 24h e 48h si osserva sia l'induzione che repressione dei geni *Cytochrome p450* e *Cytochrome p450 monooxygenase*. Esistono due grandi classi di questi enzimi, entrambi hanno un ruolo di difesa essendo coinvolti sia nella detossificazione di molecole tossiche sia nella biosintesi di un ampio range di molecole associate con la difesa e la trasduzione del segnale (Li et al., 2002). A 48h risulta down regolato un altro gene, *S-adenosyl-L-methionine synthase*, che codifica per l'enzima SAM sintasi che porta alla formazione del composto SAM, precursore nel pathway di sintesi delle poliammine, in particolare spermidine e spermine. A 24h uno dei geni coinvolti nella sintesi di tale molecole risulta essere up regolato, *Polyamine oxidase*, mentre a 48h

si raggiunge una down regolazione di diversi geni coinvolti in tali pathway, quali *Arginine decarboxylase*, *Spermidine synthase*, *Ornithine decarboxylase*. Le poliammine sembrano che intervengano nella protezione della cellula contro un ampio range di stress tra cui il danno ossidativo dovuto all'eccessiva generazione di specie reattive dell'ossigeno (Alcazar et al., 2006). A 48h, diversi geni coinvolti nella biosintesi di composti quali i fenilpropanoidi risultano ancora una volta down regolati. Tra questi si ritrovano *Anthranilate n-benzoyltransferase*, *Cinnamic acid 4-hydroxylase*, *Phenylcoumaran benzylic ether reductase -like protein*, *4-coumarate: ligase* e risulta fortemente sottoespresso il gene *Trans-caffeoyl-coa 3-o-methyltransferase-like protein* il quale codifica per un enzima chiave nella biosintesi della lignina (Eckardt, 2002) e sembra essere coinvolto nel rafforzamento della parete cellulare in seguito ad attacco di agenti patogeni (Schmitt et al., 1991). Tuttavia a 24h risulta essere indotto il gene *Cer1 (Eceriferum 1) octadecanal decarbonylase*, il quale codifica per una enzima che converte i composti aldeidici a lunga catena in alcani, uno step chiave nella biosintesi delle cere epicutcolari (Aarts et al., 1995). Inoltre anche diversi geni coinvolti nella biosintesi degli alcaloidi quali, *Dimethylaniline monooxygenase*, *Tropinone reductase I*, *Tropinone reductase II*, mostrano bassi livelli di espressione a 48h e con il gene *Tropinone reductase II*, maggiormente sottoespresso a 24h. Interessante notare come a 24h risultano down regolati alcuni geni coinvolti nella biosintesi di vitamine quali, *Myo-inositol oxygenase*, *Thiamin biosynthetic enzyme* e *Thiazole biosynthetic enzyme* coinvolto nella sintesi dell'acido ascorbico e della vitamina B1. La sottoespressione di questi geni può rappresentare un tentativo della pianta di ridurre il valore nutrizionale del succo floematico. Infatti anche a 96h si osserva una sottoespressione dei geni coinvolti nella sintesi della tiamina. Risulta sottoespresso il gene *Allantoinase putative* che codifica per un enzima coinvolto nel metabolismo degli ureidi composti ricchi in azoto che sono importanti per il trasporto e la distribuzione di tali sostanze nella pianta. Infine, 31 geni che codificano per enzimi coinvolti nella sintesi di composti secondari della pianta quali terpenoidi, flavonoidi e composti aromatici sono differenzialmente espressi in risposta all'attacco dell'afide.

### 5.3.7 Geni correlati all'organizzazione cellulare

Un totale di 68 geni codificanti per proteine putativamente coinvolte nello sviluppo e nel sostentamento/organizzazione cellulare sono differenzialmente espresse nelle piante infestate (Appendice: tabella A.1, A.2, A.3). Ad esempio a 24h dall'infestazione, il gene *ATP binding/myosin heavy chain-like protein* coinvolto nel trasporto vescicolare, risulta up regolato, mentre a 48h si osserva una downregolazione di geni coinvolti nell'organizzazione del citoscheletro quali *Formin-like protein* e *profilin*. Inoltre, a 48h sono up e down regolati rispettivamente i geni *Cyclin d1-dependent protein kinase regulator* e *Cyclin D2 protein* che codificano per le due classi di proteine fondamentali che costituiscono il sistema di controllo del ciclo cellulare. Inoltre, diversi geni coinvolti nel metabolismo del DNA, dei nucleotidi e della cromatina risultano up e down regolati nei primi due tempi di infestazione, come i geni *Histone h1*, *Histone h2a*, *Histone h4* coinvolti nel processo di compartimentalizzazione della cromatina sono sottoespressi dopo 48h dall'infestazione.

### 5.3.8 Geni correlati al trasporto

Infine un totale di 42 geni differenzialmente espressi correlati al trasporto sono up e down regolati nelle piante infestate rispetto alle piante controllo nei tre tempi analizzati (Appendice: tabella A.1, A.2, A.3). L'attacco di *M. euphorbiae* induce, infatti, diversi geni che codificano per proteine putativamente coinvolte nel trasporto dei carboidrati, degli aminoacidi e dell'acqua. Tra questi, i geni *Amino acid permease* e *Nitrate transporter ntl1* risultano down regolati a 24h, mentre a 48h e 96h si osserva una risposta contrastante con l'up regolazione dei geni *Nitrate transporter*, *Amino acid transporter* e *Cationic amino acid transporter*. Inoltre diversi geni che codificano per trasportatori di membrana vacuolari, quali *Vacuolar proton ATPASE A3* e *Vacuolar protein sorting-associated protein 41 homolog*, sono sovraespressi anche se a livelli modesti a 24h e 48h, rispettivamente. Infine, per i primi due tempi di induzione sono downregolazione i geni *Aquaporin NIP1* e *Aquaglyceroporin-tonoplast intrinsic protein (TIPa)*, il che implica un'alterazione dell'omeostasi cellulare in risposta al danno provocato dall'alimentazione dell'afide.

### 5.4 Validazione mediante Real-time PCR dei geni selezionati dall'analisi trascrittomica

Per la conferma dei dati di espressione ottenuti dallo studio trascrittomico, sono stati selezionati nove geni risultati differenzialmente espressi nelle piante nei tre tempi di infestazione. In particolare, l'analisi è stata condotta su dei geni che sono stati annotati come putativamente coinvolti nelle risposte di difesa della pianta quali *Nim2c*, *AP2/ERF*, *RLK1*, *WRKY 40*, *Inh1*, *Inh2*, *PR1*, *P4* e *LapA*. La validazione dei dati è stata condotta sull'RNA utilizzato per l'ibridazione degli array Tomato 4X44K. Per saggiare la qualità del cDNA sintetizzato, sono state effettuate delle prove di amplificazione con la coppia di primer StbEF Fw- LeEF Rv disegnati sul gene *EF1- $\alpha$*  che codifica per un fattore di elongazione espresso in maniera costitutiva in quasi tutte le cellule eucariotiche. I risultati dell'amplificazioni sono riportati nella figura 5.5.

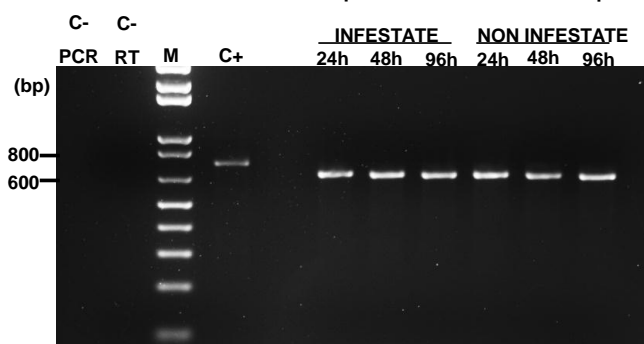
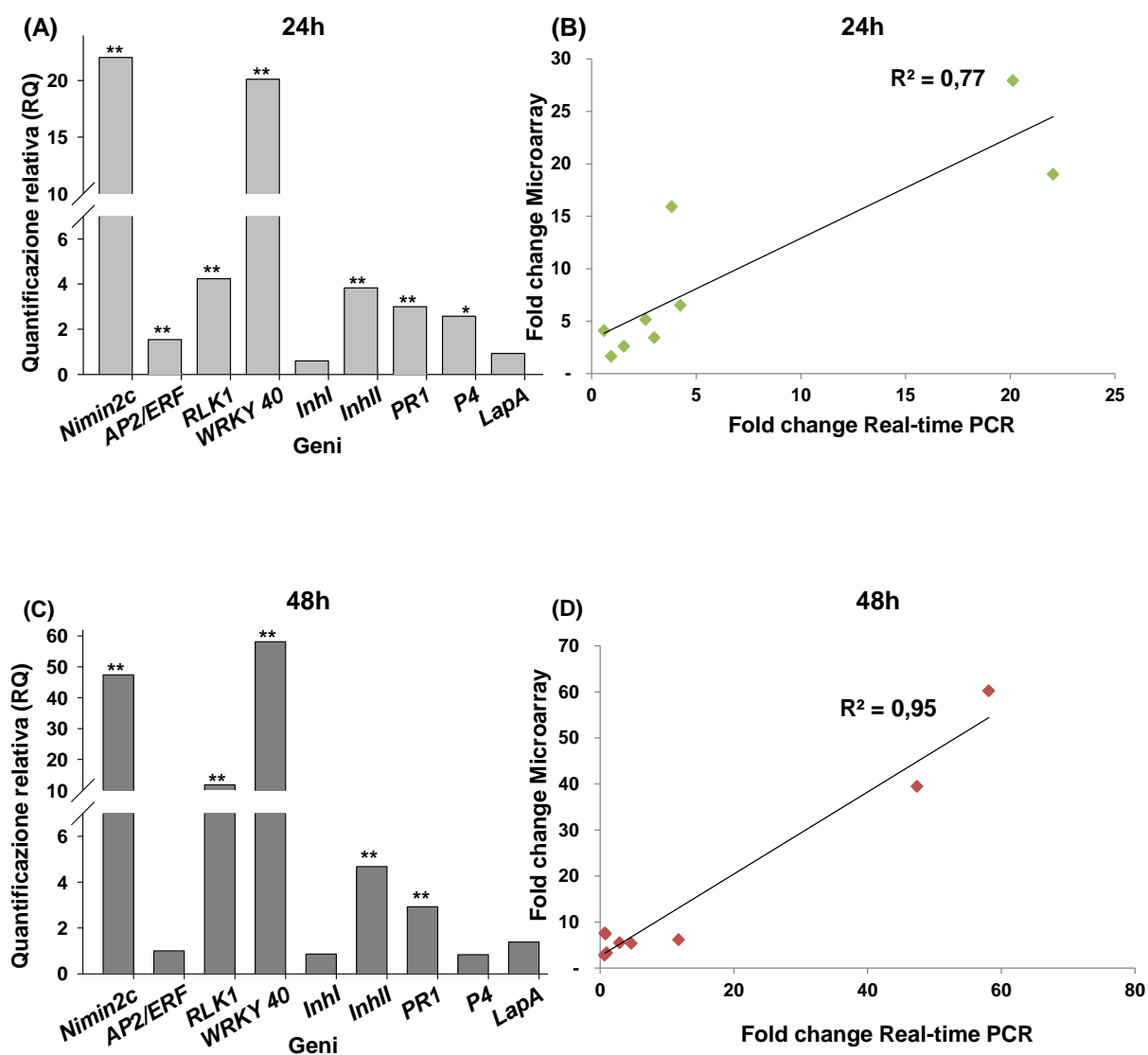


Figura 5.5: Separazione elettroforetica dell'amplificato del gene *EF1- $\alpha$*  per monitorare la qualità dei retrotrascritti. M: 1Kb plus ladder (Invitrogen); C- PCR: controllo negativo della PCR, mix priva di template; C- RT: controllo negativo della sintesi del cDNA; C+: controllo positivo, amplificazione di DNA genomico di pomodoro; INFESTATE: Singola replica biologica di piante sottoposte all'infestazione con l'afide *M.euphorbiae* e raccolte dopo 24h, 48h e 96h; NON INFESTATE: Singola replica biologica piante non sottoposte all'infestazione e raccolte dopo 24h, 48h e 96h.

Il cDNA ottenuto è stato utilizzato per l'analisi di espressione dei geni selezionati dall'analisi trascrittomica. Per tali l'analisi è stato scelto come controllo endogeno il gene *EF1- $\alpha$* , gli esperimenti effettuati mostrano una quantificazione ottenuta confrontando i valori d'espressione dei geni target precedentemente normalizzati

rispetto a quelli del controllo endogeno sia nel tempo in esame che nel calibratore. In figura 5.6 sono riportati i valori di espressione relativa dei geni scelti per la validazione per i tre tempi oggetto di studio 24h, 48h e 96h e la correlazione tra i fold change, per ognuno dei tre tempi ottenuti per i due esperimenti, rispettivamente.



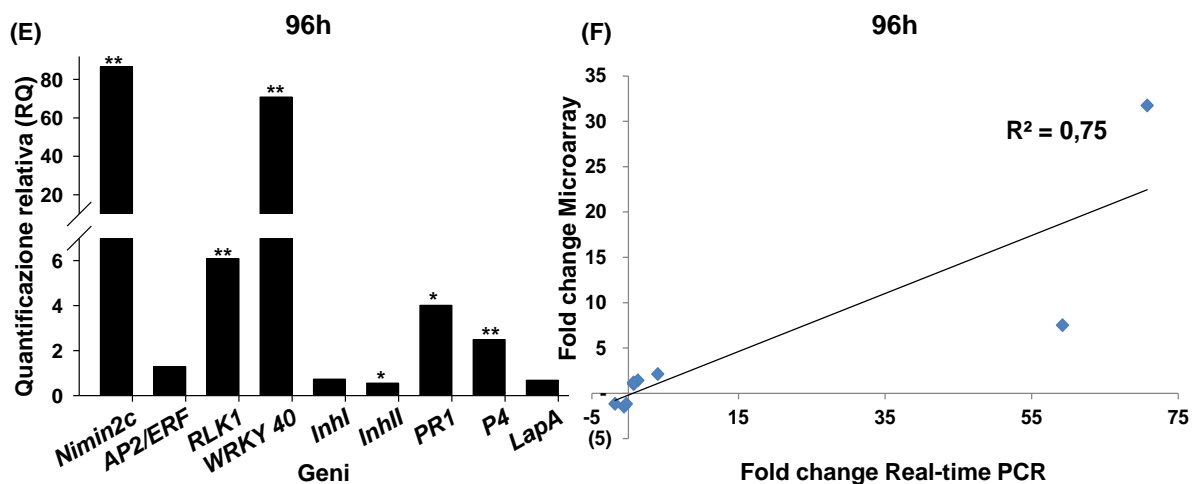


Figura 5.6: Validazione dei dati microarray mediante Real-time PCR. I grafici A, C e E mostrano i livelli di espressione relativi di ogni gene nelle piante infestate, a 24h, 48h e 96h rispettivamente, rispetto alle piante controllo, utilizzate come calibratore. Gli asterischi indicano differenze significative di espressione dei geni fra le piante infestate e controllo (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ ;  $t$ -test).

I grafici B, D e F mostrano la correlazione dei valori di fold change tra i dati microarray e Real Time in scala lineare, per i tre tempi di infestazione 24h, 48h e 96h rispettivamente. È riportato l' $R^2$ .

Per i tre tempi considerati, esiste una correlazione positiva e significativa tra i valori di fold change ottenuti tra lo studio trascrittomico e l'analisi Real time PCR.

## 5.5 Identificazione delle proteine prodotte in seguito all'attacco dell'afide *Macrosiphum euphorbiae*

È stata condotta un'analisi proteomica per investigare quali fossero i cambiamenti indotti nel profilo proteico in foglie di piante di pomodoro in seguito ad attacco dell'afide *M. euphorbiae*. Tale analisi è stata eseguita presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Biologiche ed Ambientali (Università del Sannio) in collaborazione con la Dott.ssa M. Rocco.

In collaborazione con la Prof.ssa C. Digilio del Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria dell'Università di Napoli "Federico II" è stato eseguito un saggio di infestazione utilizzando come ospite piante di pomodoro 'Microtom' di quattro settimane e come insetto fitomizo l'afide *M. euphorbiae*. Il materiale fogliare è stato raccolto dopo 48h dall'inizio dell'infestazione. Successivamente è stata effettuata un'estrazione delle proteine totali e separazione delle stesse mediante elettroforesi bidimensionale (figura 5.7)

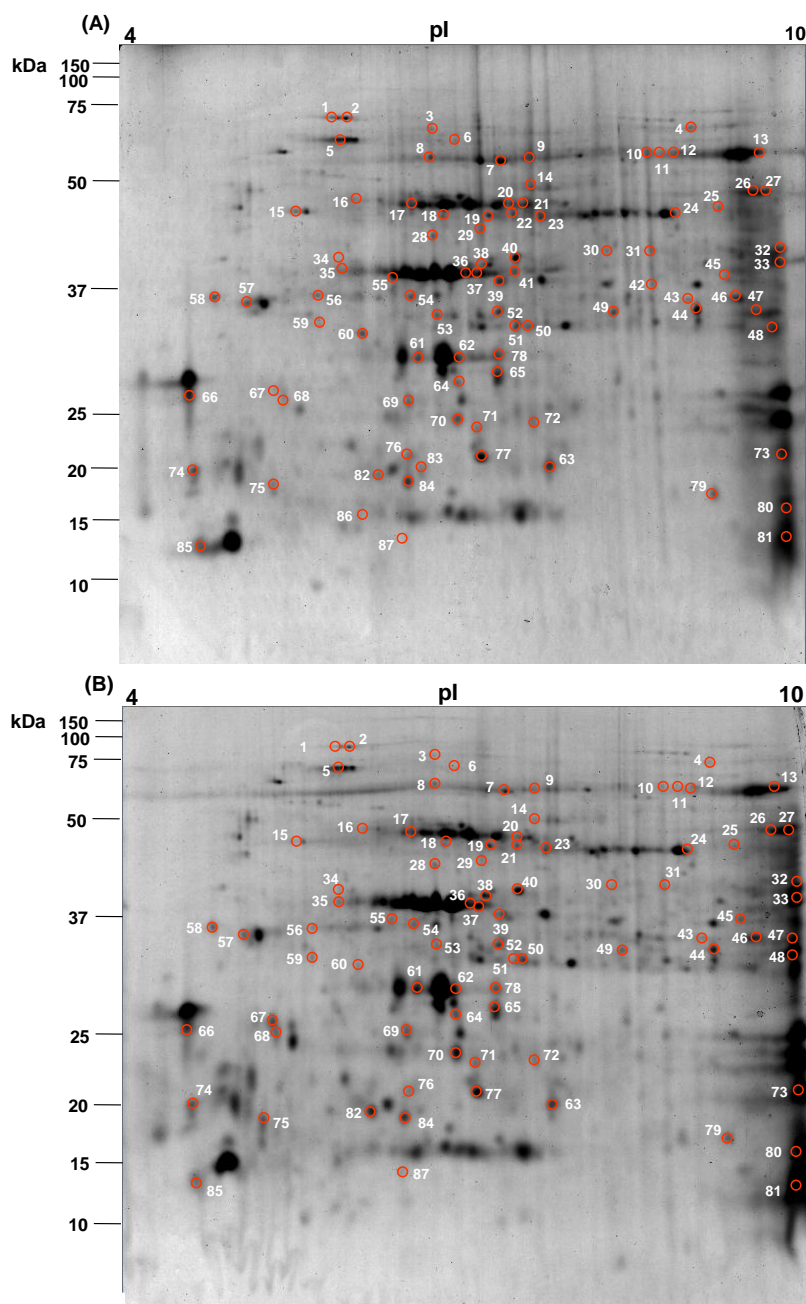


Figura 5.7: Elettroforesi bidimensionale di proteine totali estratte da piante di pomodoro non infestate (A) e piante infestate (B) con l'afide *M. euphorbiae*. I numeri indicano le proteine differenzialmente espresse tra le piante infestate e le piante controllo.

Dopo aver selezionato il gel più rappresentativo in termine di numero di spot e di rumore di fondo, allineati tutte le mappe dei gel appartenenti al gruppo controllo e al gruppo infestato, l'intensità di ogni spot è stata normalizzata e sono state condotte le analisi quantitative e statistiche col fine di identificare gli spot differenzialmente espressi dopo attacco dell'afide. Gli spot identificati dal software come qualitativamente e quantitativamente differenti sono stati considerati per le successive analisi solo se in tutte le repliche erano statisticamente significativi (Student's t-test;  $p < 0.05$ ). Ciò ha permesso di identificare 87 spot differenzialmente espressi nelle piante infestate, con almeno un'intensità relativa aumentata o diminuita di 2 volte rispetto al controllo. Gli spot, sono stati tagliati, digeriti con tripsina, ed analizzati i prodotti tramite analisi MALDI-TOF o  $\mu$ LC-ESI-ITMS/MS. I

risultati ottenuti sono stati utilizzati per effettuare il Peptide Mass Fingerprint (PMF) alla ricerca di omologie con proteine note. Dal confronto nella banca dati UniProt della sequenza aminoacidica *query* con l'insieme delle sequenze proteiche già annotate si è potuto risalire alle proteine corrispondenti. L'analisi ha evidenziato che degli 87 spot, 49 contenevano una singola proteina. Per facilitare la visualizzazione dei pattern nei dati proteici, è stata generata un *heatmap* mediante clustering gerarchico, utilizzando le 49 proteine che sono risultate differenzialmente espresse nelle piante infestate rispetto alle piante controllo (figura 5.8).

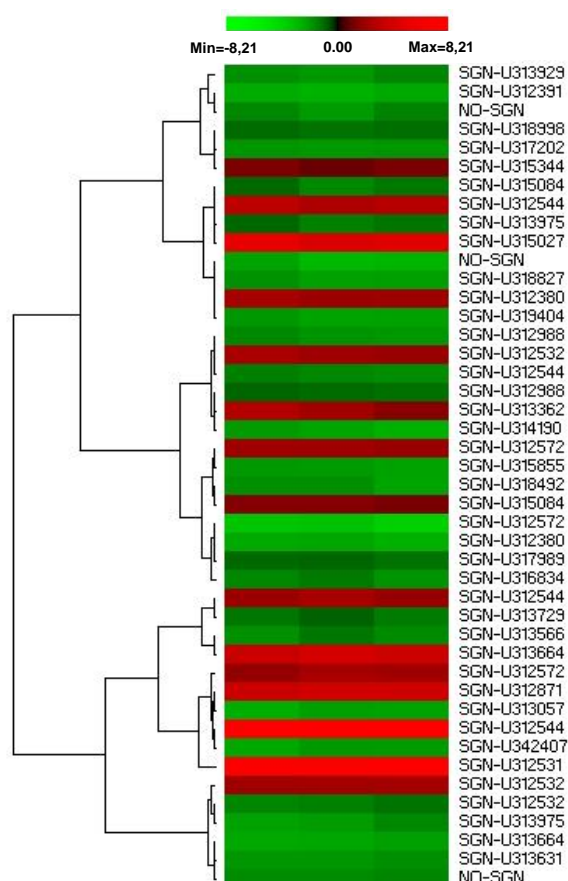


Figura 5.8: Rappresentazione del clustering gerarchico dei dati proteomici, come heat map. I campioni sperimentali sono raggruppati sull'asse orizzontale e gli spot proteici differenzialmente espressi sull'asse verticale. La barra indica i valori dei fold change su scala log2. SGN: numero di accensione della banca dati Sol Genomics network delle sequenze corrispondenti alle proteine differenzialmente espresse; NO-SGN: proteine per cui non è stata trovata corrispondenza con una sequenza della banca dati Sol Genomics network.

Le proteine differenzialmente espresse, corrispondenti ad uno spot singolo, sono state annotate funzionalmente nella categoria funzionale quale processo biologico tramite l'uso del software Blast2GO. Il 100% delle sequenze sottoposte all'analisi funzionale sono state annotate e il 35% di tale sequenze ha mostrato una similarità di sequenze con proteine note di *Solanum lycopersicum* o specie appartenenti alla famiglia delle Solanacee. Nel grafico riportato in figura 5.9 è rappresentata la distribuzione percentuale delle proteine annotate, sulla base del processo biologico in cui esse sono coinvolte.



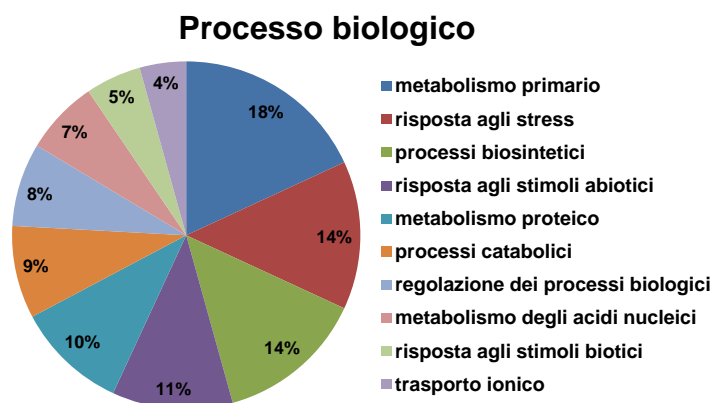


Figura 5.9: Diagramma della distribuzione percentuale delle proteine differenzialmente espresse classificate in diverse categorie di funzione molecolare in accordo con il consorzio Gene Ontology.

Il processo biologico in cui rientrano la maggior parte delle proteine differenzialmente espresse riguarda il metabolismo primario (18%). Ciò è in accordo con quanto riportato in altri lavori, in quanto, sono documentati cambiamenti nel metabolismo primario e nel processo fotosintetico dopo attacco d'insetti (Macedo et al. 2003; Divol et al. 2005; Giri et al. 2006). Il secondo processo biologico è rappresentato dalle risposte agli stress (14%). Sulla base dell'annotazione funzionale e con il supporto della letteratura, le proteine differenzialmente espresse sono state raggruppate in differenti categorie funzionali. Sebbene alcune proteine siano coinvolte in più processi metabolici, esse sono state classificate tenendo conto del loro ruolo principale nel metabolismo della pianta. E' stato possibile identificare cinque categorie funzionali: i) Fotosintesi e metabolismo dei carboidrati; ii) Trasporto degli elettroni; iii) Risposta agli stress ossidativi; iv) Stress e risposte di difesa; v) Sintesi e degradazione proteica.

Quattordici spot identificati corrispondono alla stessa proteina, ma hanno un differente livello di espressione. Possibile spiegazione di tale differenza potrebbe essere associata all'esistenza di diverse isoforme di queste proteine e induzione di un'unica isoforma dopo attacco dell'afide. Ulteriore spiegazione potrebbero essere le modifiche post-trascrizionali a cui vanno incontro le proteine, un meccanismo biologico che ha un ruolo chiave nella trasduzione del segnale.

Circa il 50% delle proteine identificate in pomodoro in seguito all'attacco dell'afide, sono coinvolte nel processo di fotosintesi e nel metabolismo primario della pianta (Appendice: tabella A.4). La maggior parte di queste proteine ha mostrato un livello di espressione incrementato. Queste includono Oxygen-Evolving Enhancer Protein 1(OEE1) (spot 35, 36, 37 e 41), Oxygen-Evolving Enhancer Protein 2 (OEE2) (spot 61, 62, 65 e 78), Photosystem II Oxygen-Evolving Complex Protein 3 (OEE3) (spot 73), ATP Synthase Subunit beta (spot 7, 8 e 9), Rubisco Activase (spot 17, 20, 21 e 59), Serine Hydroxymethyltransferase (spot 13 e 11) e Aminomethyltransferase (spot 27 e 26). Altre proteine appartenenti a questo gruppo funzionale sono invece down regolate così come: triosephosphate isomerase (spot 44, 49 e 53), ribulose biphosphate carboxylase small chain 1 (spot 86).

I livelli di espressione delle proteine OEE1, OEE2 e OEE3 risultano aumentati nelle piante infestate, così come la proteina ATP synthase beta subunit, rispetto alle piante controllo. Queste proteine svolgono un ruolo chiave nel meccanismo fotosintetico responsabile della produzione di energia, mentre enzimi coinvolti nei processi metabolici dei carboidrati risultano down regolati come triosephosphate isomerase e ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small-subunit protein. Precentemente Yang et



al., (2003) hanno suggerito che la proteina OEE2 potrebbe essere una molecola a valle del pathway di segnale in cui agisce il complesso AtGRP-3/WAK1, complesso che potrebbe essere coinvolto nelle risposte di difesa mediate dall'acido salicilico, in piante di *Arabidopsis*. È interessante notare come l'afide è in grado di attivare in pomodoro enzimi coinvolti nel processo di fotorespirazione, quale l'Aminomethyltransferase e Serine hydroxymethyltransferase, che giocano un ruolo chiave nel meccanismo dissipatore della pianta, riducendo la produzione delle specie reattive dell'ossigeno e moderando il danno ossidativo della cellula. Inoltre, tra le proteine upregolate è stata identificata la ferredoxin-1 (spot 66 e 74). Tale proteina, durante la fotosintesi, accetta gli elettroni provenienti dal PSI e riduce una molecola di NADP<sup>+</sup> attraverso l'azione della ferredossina-NADP<sup>+</sup> reduttasi. Allo stesso modo anche la proteina Mitochondrial outer membrane protein porin (VDAC) (spot 33) risulta essere indotta in seguito all'attacco di *M. euphorbiae* rispetto alle piante controllo. È una proteina della membrana esterna dei mitocondri ed è probabile che tale proteina sia coinvolta nelle risposte di difesa, possibilmente attraverso la regolazione dell'apertura dei pori di transizione mitocondriale (PTP), con conseguente rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dal mitocondrio.

Tra le proteine correlate al trasporto degli elettroni sono state identificate le proteine Apocytochrome f (spot 31) e Plastocyanin, chloroplastic (spot 85). Le proteine Plastocyanin e Cytochrome f entrano in gioco nel meccanismo di trasporto degli elettroni durante il processo fotosintetico e il loro basso livello di espressione, 0,22 e 0,18 rispettivamente, potrebbe riflettere un generale decremento del tasso fotosintetico della pianta, conseguente l'attacco dell'afide.

Le proteine differenzialmente espresse correlate alle risposte di difesa agli stress ossidativi identificate sono state Thioredoxin Peroxidase 1 (spot 64) e Oxidoreductase, Zinc-Binding Dehydrogenase Family Protein (spot 23). Entrambe queste proteine sono risultate down regolate nelle piante infestate. Questi enzimi entrano in gioco nel sistema antiossidante cellulare coinvolto nella tolleranza agli stress ossidativi, causati dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Dos Santos e Rey 2006).

Diverse proteine correlate alla risposta di difesa sono state identificate come differenzialmente espresse ovvero: Chloroplast Heat Shock Protein 70 (spot 1 and 2), Nucleoside Diphosphate Kinase 1 (spot 79), Glycine-Rich RNA-Binding Protein (spot 77), RNA Recognition Motif (RRM) (spot 58), Putative RNA-Binding Protein (spot 25 and 56) e probable Plastid-Lipid-Associated Protein 6 (spot 55). Per tutte queste proteine è stata osservata una loro down regolazione. Le proteine Glycine-Rich RNA-Binding Protein, Putative RNA-Binding Protein e RNA Recognition Motif (RRM) sono coinvolte in diversi processi biologici quali sviluppo, organizzazione del genoma, risposta a stress e trasduzione del segnale. Sebbene la proteina Nucleoside Diphosphate Kinase I (NDPK), appartiene ad una classe di enzimi coinvolti nel mantenimento dell'equilibrio tra ATP e gli altri nucleotidi trifosfati, in riso è stato osservato un'induzione di tale proteina dopo attacco batterico (Cho et al., 2004). La proteina Plastid Lipid-Associated Proteins, anche definita fibrillina/CDSP34, si accumula nelle foglie delle piante appartenenti alla famiglia delle solanaceae quando sottoposte a condizioni di stress o ad infezioni fungine/batteriche (Langenkamper et al. 2001; Leitner-Dagan et al. 2006). Anche se è bene noto che le Heat shock protein 70 (HSP70) sono indotte da un ampio range di stress, recentemente è stato scoperto un suo possibile coinvolgimento nelle risposte di difesa contro agenti patogeni (Galis et al 2004). L'ultima categoria funzionale delle proteine differenzialmente espresse concerne la sintesi e degradazione proteica. Tra

le proteine differenzialmente espresse sono state identificate Elongation Factor TuB (spot 14), Chaperonin 21 (spot 51), Chloroplast Chaperonin 10 (spot 87), Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase, putative (spot 28 e 15), Proteasome subunit alpha type-6 (spot 43), FtsH-like protein Pftf (spot 3), Chloroplast-Specific Ribosomal Protein (spot 38), DegP Protease\_Serine-Type Peptidase (spot 19) e Protein Binding Protein, Putative (spot 40), ognuna svolge un ruolo chiave nei processi di traduzione, assemblaggio e folding proteico e proteolisi. Tutte le proteine hanno mostrato una down regolazione, eccetto per chaperonin 21, evidenziando come la sintesi proteica e i pattern di secrezione cambiano drammaticamente nelle piante infestate.

## 5.6 Confronto tra lo studio microarray e l'analisi proteomica di piante di pomodoro infestate con l'afide *M. euphorbiae*

È stato effettuato un confronto tra l'analisi trascrizionale e quella proteomica con lo scopo di individuare se ci fosse una corrispondenza tra i trascritti e le proteine differenzialmente espresse in seguito all'attacco dell'afide. Il confronto è stato effettuato per tutti gli spot proteici, che rispetto al controllo, risultavano deregolati cioè sia quelli che identificavano una singola proteina che più proteine.

Per l'analisi comparativa dei dati trascrittomici e proteomici, è stata condotta un'indagine nella banca dati NCBI per ricercare sequenze EST di pomodoro corrispondenti alle proteine differenzialmente espresse. Su un totale di 321 proteine differenzialmente espresse, per 291 è stata ritrovata almeno una sequenze EST corrispondente. Successivamente è stato effettuato un controllo di tali sequenze EST sull'array tomato 4x44K, per verificare la loro presenza e individuare la corrispondente probe in modo da provare se tale probe fosse tra quelle differenzialmente espresse dell'analisi trascrittomica. In tabella 5.3 sono riportate le proteine per cui è stata ottenuta corrispondenza con un trascritto up o down regolato nei tempi 24h e 48h, tempi per cui è stata ritrovata almeno una probe che corrispondesse con una proteina differenzialmente espressa, e i valori di espressione del trascritto e della corrispondente proteina.

Tabella 5.3: Elenco delle proteine e dei trascritti corrispondenti ottenute dal confronto tra lo studio trascrittomico e proteomico.

Descrizione	Probe	Fold change		
		Proteomica 48h	Trascrittomica	
			24h	48h
Cytosol aminopeptidase family protein	A_96_P265847	s.m	-	2,79
Thiazole biosynthetic enzyme	A_96_P134237	s.m	-2,65	-
Ankyrin repeat family protein	A_96_P144951	s.m	-	2,37
Photosystem II oxygen-evolving complex protein 3	A_96_P010426	14,4	-	-2,35
Protochlorophyllide reductase B	A_96_P010331	s.m	-2,06	-
Translationally controlled tumor family protein	A_96_P163066	s.m	-	2,49
Ribulose biphosphate carboxylase small chain 1	A_96_P148151	off	-	-2,23
Glycine/Serine hydroxymethyltransferase	A_96_P059256	0,42	-	-2,10
Glycine/Serine hydroxymethyltransferase	A_96_P059256	2,59	-	-2,10
Chaperonin (CPN60) (HSP60)	A_96_P237472	s.m	-2,14	-
Glycine cleavage system H protein	A_96_P148166	s.m	-	-2,89
Allergen V5	A_96_P143681	s.m	-	5,51
tRNA-binding region domain-containing protein	A_96_P204779	s.m	2,03	-
Translationally controlled tumor family protein	A_96_P161896	s.m	-	2,17

Legenda: s.m.: spot multiplo; off: proteina non espressa nelle piante infestate; trattino: probe non presente nel tempo di infestazione considerato.

Sono state identificate 13 probe che hanno mostrato corrispondenza con una proteina identificata dall'analisi proteomica, e 3 di queste probe (A\_96\_P010426, A\_96\_P148151, A\_96\_P059256) rappresentano proteine identificate in un spot singolo. Esiste poca corrispondenza per molti dei trascritti identificati e le proteine, quindi non sempre i livelli di mRNA sono predittivi della corrispondente espressione proteica. Bisogna evidenziare che l'analisi proteomica è stata condotta su un numero di proteine limitato rispetto a quello dei geni analizzati con i Tomato array: mentre le proteine visualizzate tramite le tecniche utilizzate sono circa 400, i geni sono circa 22000.

### 5.7 La performance dell'afide *Myzus persicae* è influenzata dall'insetto terricolo *Agriotes lineatus*

Per investigare l'impatto della presenza di un insetto terricolo (*Agriotes lineatus*) sullo sviluppo dell'afide (*M. persicae*), è stato condotto uno studio della performance dell'afide dallo stadio di ninfa fino allo stadio di adulto, quando fatto crescere su piante contemporaneamente attaccate anche dall'insetto terricolo. Pertanto su piante di pomodoro controllo, prive dell'insetto terricolo, e piante di pomodoro infestate con larve dell'elateride sono state trasferite ninfe primo giorno dell'afide *M. persicae*. Per la valutazione della performance sono stati determinati i seguenti parametri: tempo di sviluppo (numero di giorni impiegati dall'afide per raggiungere lo stadio adulto e produrre la prima generazione), capacità di riproduzione (numero di ninfe prodotte ed il peso fresco e secco dell'afide).

È stato osservato che la presenza dell'insetto terricolo significativamente influisce sulla performance dell'afide. Il tempo di sviluppo degli afidi, cresciuti sulla piante infestate da *A. lineatus*, risulta allungato di circa 3 giorni rispetto agli afidi su piante non infestate dall'insetto terricolo (figura 5.10). Inoltre, è influenzata significativamente anche la capacità di riproduzione dell'afide, in quanto il numero di ninfe prodotte dagli afidi adulti cresciuti su piante infestate è più basso rispetto alle piante controllo (figura 5.10).

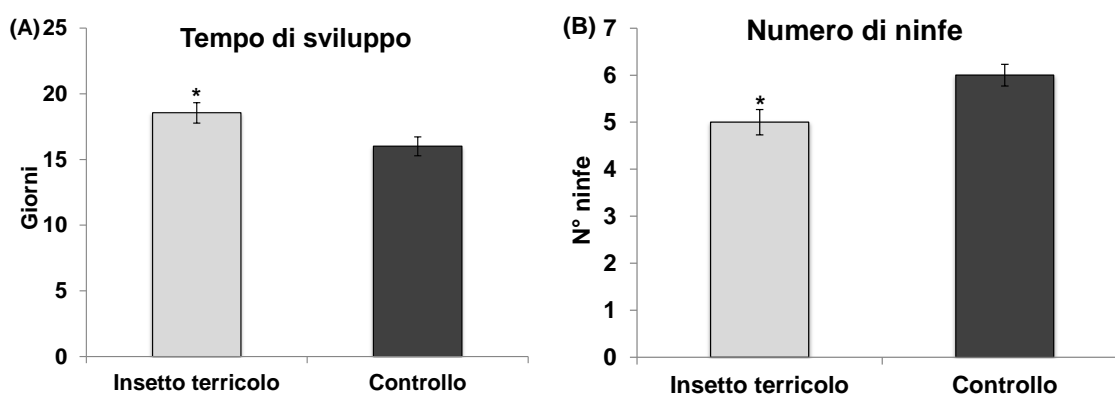


Figura 5.10: Media  $\pm$  errore standard del tempo di sviluppo (A) e del numero di ninfe (B) di *M. persicae* su piante di pomodoro che sono state esposte ad *Agriotes lineatus* (insetto terricolo) e non (controllo). (\*:  $p < 0,05$ ; t-test).

È stato osservato un effetto negativo della presenza dell'insetto terricolo anche sul peso fresco dell'afide *M. persicae*, con una diminuzione significativa rispetto agli afidi cresciuti sulle piante non infestate (figura 5.11).

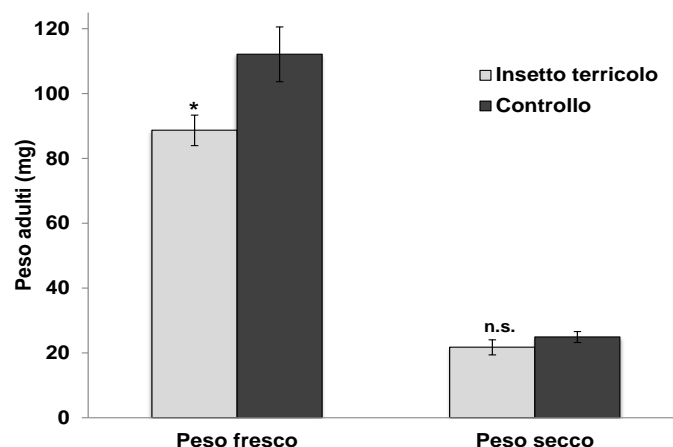


Figura 5.11: Peso degli adulti (media  $\pm$  errore standard) di *M.persicae* su piante di pomodoro che sono state esposte ad *Agriotes lineatus* (insetto terricolo) e non (controllo); (\*:  $p < 0,05$ ; n.s.,  $p > 0,05$ ; t-test).

Per verificare se le differenze osservate tra gli afidi cresciuti sulle piante controllo e sulle piante infestate siano correlate ad una possibile alterazione della biomassa tra la parte aerea e le radici delle piante sottoposte all'attacco dell'insetto terricolo è stato misurato il peso secco delle radici e dei germogli delle piante controllo e delle piante infestate. Le piante sottoposte ad entrambi i trattamenti (insetto terricolo e controllo) mostrano una simile biomassa della parte aerea, ma l'insetto terricolo significativamente diminuisce la biomassa radicale rispetto alle piante controllo (figura 5.12).

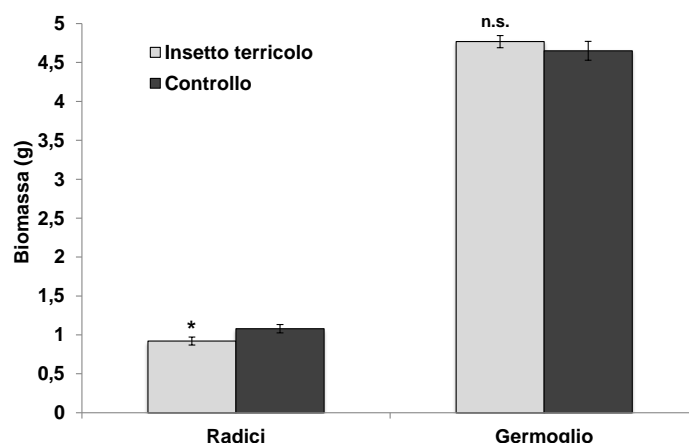


Figura 5.12: Peso medio  $\pm$  errore standard della biomassa delle radici e dei germogli di *M.persicae* su piante di pomodoro che sono state esposte ad *Agriotes lineatus* (insetto terricolo) e non (controllo); (\*:  $p < 0,05$ ; n.s.,  $p > 0,05$ ; t-test).

## 5.8 Saggio di preferenza del parassitoide *Diaeretiella rapae*

Per valutare se la presenza dell'insetto terricolo potesse influenzare il terzo livello trofico, rappresentato dal parassitoide *Diaeretiella rapae*, è stato condotto uno studio comportamentale del parassitoide dando la possibilità di poter scegliere tra le seguenti combinazioni di trattamenti: piante di pomodoro infestate con il suo ospite (*M. persicae*) verso piante di pomodoro infestate con l'insetto terricolo (*A. lineatus*) più il suo ospite (*M. persicae*) e piante senza l'ospite (controllo) verso piante infestate solo con l'insetto terricolo. La scelta del parassitoide non è stata significativamente influenzata da *A. lineatus* quando il suo ospite *M. persicae* è presente su foglie di piante di pomodoro attaccate e non dall'insetto terricolo (figura 5.13). Infatti per entrambi i trattamenti è stato ottenuto approssimativamente il 50% di scelte. Uno

stesso trend, è stato osservato anche per piante infestate solo dall'insetto terricolo verso piante prive di infestazione, infatti, il parassitoide ha compiuto un uguale numero di voli verso entrambi i trattamenti (figura 5.13).

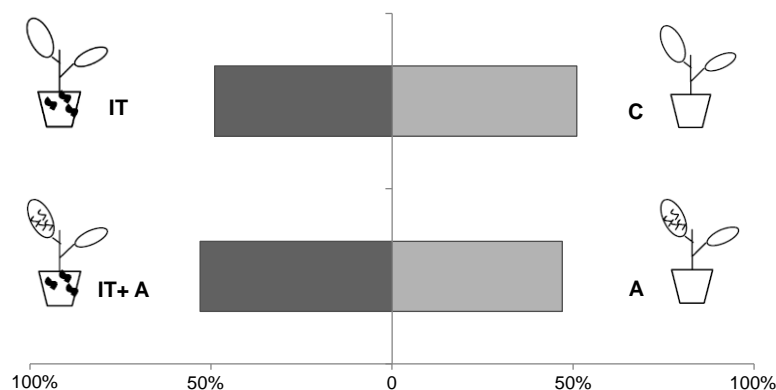


Figura 5.13: Percentuale di scelte del parassitoide *D. rapae* tra piante esposte: all'insetto terricolo *A. lineatus* e l'ospite *M. persicae* (IT+A) vs piante esposte solo all'ospite *M. persicae* (A); all'insetto terricolo *A. lineatus* (IT) e piante non sottoposte ad alcuna infestazione (C).

Quindi, l'attrattività della pianta verso il parassitoide, *D. rapae*, non è alterata dalla presenza dell'insetto terricolo.

## 5.9 Analisi di espressione dei geni di difesa in pianta di pomodoro sottoposte al duplice attacco

Per investigare quali fossero le risposte di difesa indotte in seguito al danno provocato dall'azione individuale o combinata dell'insetto terricolo e della parte aerea, è stata condotta un'analisi di espressione di geni scelti sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi trascrittomica. Specificatamente sono stati selezionati dei geni putativamente coinvolti nei meccanismi di difesa delle piante agli stress biotici, quali *Dehydrin (DEH)*, *Threonine deaminase (TD)*, *proteinase inhibitors II (InhII)*, *pathogenesis related protein 1 (PR1)*, *Nimin2c*, *ACC oxidase (ACO)*. Tali geni, infatti, sono risultati differenzialmente espressi dallo studio microarray.

I geni *TD* e *InhII* codificano per proteine con azione antinutritiva, in grado di alterare la digestione dell'insetto. Sono geni dipendenti dall'acido giasmonico e attivamenti indotti in seguito a ferita o attacco di erbivori. Il gene *Nimin2c* codifica per una proteina che interagisce con NPR1 e regola l'espressione delle proteine correlati alla patogenesi in particolare PR1. È noto che l'induzione di geni codificanti per proteine correlate alla patogenesi (PR) rappresenta un buon marcatore delle risposte dipendenti dall'acido salicilico. Il gene *ACO* codifica per l'enzima ACC ossidasi, enzima chiave nella biosintesi dell'etilene. Infine il gene *DEH* è indotto in seguito a trattamenti esogeni con l'acido abscissico (ABA).

Per studiare, quindi, le risposte di difesa della pianta sono stati eseguiti dei saggi di infestazione solo con l'insetto terricolo *A. lineatus*, solo con l'afide *M. persicae* e con entrambi gli insetti *M. persicae* e *A. lineatus*. Il materiale vegetale per ogni trattamento è stato raccolto a 24h, 48h e 8 giorni dall'inoculo, mediante raccolta delle foglie distali, ovvero adiacenti a quelle infestate con l'afide. I risultati della quantificazione relativa dei geni selezionati, sulle piante infestate con *M. persicae* rispetto alle piante controllo (non infestato) sono illustrati nella figura 5.14.

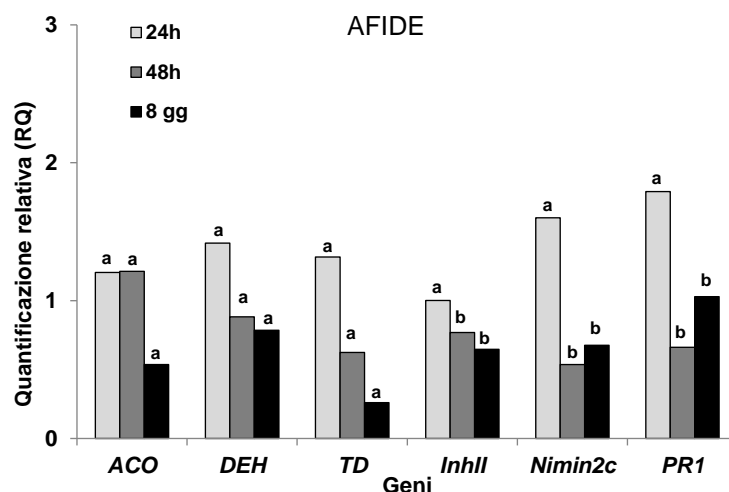


Figura 5.14: Analisi di espressione dei geni *ACO*, *DEH*, *TD*, *InhII*, *Nimin2c*, *PR1* sulle foglie delle piante infestate con l'afide *M. persicae* nei tre tempi 24h, 48h, 8 giorni mediante Real Time PCR. I livelli di espressione sono espressi in termini relativi in riferimento alle foglie delle piante non infestate fissato ad uno. Lettere diverse indicano differenze significative tra i tempi ( $p < 0,05$ ; ANOVA).

Si può osservare che, nelle foglie distali, i livelli di espressione dei geni *Nimin2c* e *PR1* aumentano in modo significativo in seguito ad attacco dell'afide, con un maggiore livello di espressione nel primo tempo di infestazione. Non si osservano differenze significative negli altri due tempi di infestazione, 48h e 8 giorni per i geni oggetto di studio fatta eccezione per il gene *PR1*.

Una risposta della pianta diversa si osserva dopo attacco dell'insetto terricolo *A. lineatus*. Infatti, già nelle prime fasi si può osservare che i livelli di espressione dei geni *ACO*, *TD*, *InhII*, *PR1* e *Nimin2c* aumentano dopo infestazione, mentre non sono state riscontrate differenze per quanto riguarda il gene *DEH* (figura 5.15). Dopo 48h, aumentano in modo significativo i livelli d'espressione dei geni *ACO*, *TD*, *Nimin2c*. Viceversa, per i geni *PR1* e *InhII*, si osserva una diminuzione dei livelli di espressione (figura 5.15). Per quanto riguarda l'ultimo tempo di infestazione è possibile osservare una generale diminuzione dei livelli di espressione dei geni precedentemente indotti, *ACO*, *TD*, *Nimin2c*, *PR1*, mentre si sono riscontrate differenze significative nei livelli di espressione per il gene *DEH* e *InhII* (figura 5.15).

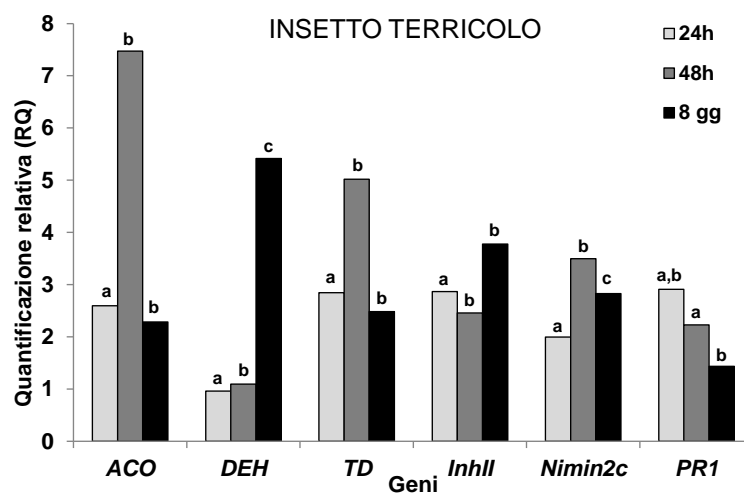


Figura 5.15: Analisi di espressione dei geni *ACO*, *DEH*, *TD*, *InhII*, *Nimin2c*, *PR1* sulle foglie distali delle piante infestate con l'insetto terricolo *A. lineatus* nei tre tempi 24h, 48h, 8 giorni mediante Real Time PCR. I livelli di espressione sono espressi in termini relativi in riferimento alle foglie delle piante non infestate fissato ad uno. Lettere diverse indicano differenze significative tra i tempi ( $p < 0,05$ ; ANOVA).

In risposta al danno provocato sia a livello radicale che fogliare, i geni oggetto di studio mostrano un profilo di espressione paragonabile al singolo attacco da parte di *A. lineatus* (figura 5.16).

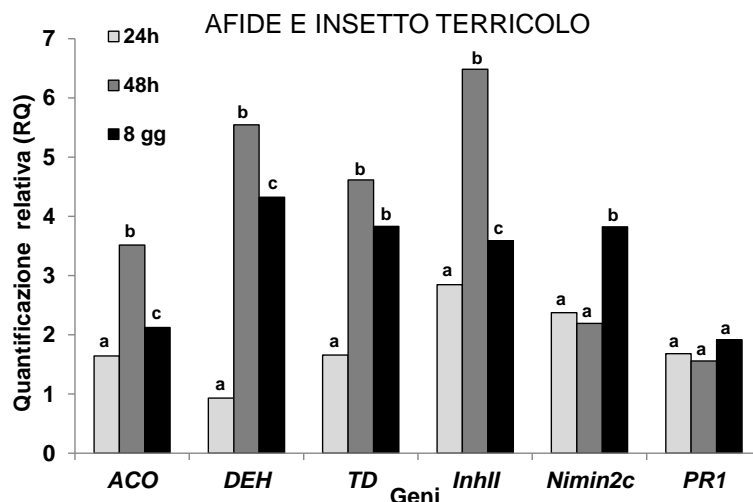


Figura 5.16: Analisi di espressione dei geni *ACO*, *DEH*, *TD*, *InhII*, *Nimin2c*, *PR1* sulle foglie distali delle piante infestate con *M. persicae* e *A. lineatus* nei tre tempi 24h, 48h, 8 gg mediante Real Time PCR. I livelli di espressione sono espressi in termini relativi in riferimento alle foglie delle piante non infestate fissato ad uno. Lettere diverse indicano differenze significative tra i tempi ( $p < 0,05$ ; ANOVA).

Come è possibile osservare dalla figura 5.16, in risposta al danno provocato sia a livello radicale che fogliare, nelle prime fasi di infestazione aumentano significativamente i livelli di espressione dei geni *InhII* e *Nimin2c*, differenze, invece, che non si osservano per gli altri geni oggetto di studio. Dopo 48h dall'attacco si riscontrano differenze maggiori nei livelli di espressione del gene *DEH* e *InhII*. Inoltre, sono indotti i geni *ACO*, *Nimin2c* e *TD*, ma si esprimono con un livello di espressione inferiore se comparato alle piante sottoposte al solo attacco dell'insetto terricolo (figura 5.15). Nell'ultimo tempo di infestazione, i geni indotti dopo 48h risultano ancora significativamente sovraespressi ma con un livello di espressione inferiore rispetto al precedente tempo di infestazione, con la possibile eccezione del gene *Nimin2c* e *PR1*, i cui livelli di espressione aumentano.

In breve, da questa analisi trascrizionale, effettuata su piante sottoposte al danno provocato da un singolo insetto dannoso o più insetti, è stato possibile verificare che a livello distale l'afide ha un impatto limitato sui i livelli di espressione dei geni analizzati, mentre l'attacco radicale da parte di *A. lineatus* induce un aumento significativo dei livelli di espressione dei geni analizzati fin dalle prime fasi di attacco e gli stessi geni restano indotti con il progredire della risposta. In risposta al danno provocato sia a livello radicale che fogliare, i geni analizzati mostrano un profilo di espressione paragonabile al singolo attacco da parte di *A. lineatus*. Tali dati indicano che l'attacco dell'insetto terricolo induce l'espressione distale di geni coinvolti anche nella risposta contro afidi, suggerendo che l'attivazione sistemica di diversi pathway di difesa del pomodoro potrebbe alterare la performance di una popolazione afidica.

## 6. DISCUSSIONI

Quando una pianta è attaccata da un agente patogeno o un insetto, è in grado di decifrare e interpretare questo segnale proveniente dall'esterno, e conseguentemente sviluppare una risposta che coinvolge tutto l'organismo. Mediante diversi processi nella cellula vegetale si verifica l'attivazione di quella cascata di eventi che regolano l'attivazione di geni coinvolti nella risposta a stress, sia a livello locale che nei tessuti non direttamente danneggiati tramite la produzione di molecole segnale (Taylor et al., 2004). Date le scarse conoscenze circa le basi molecolari dell'interazione pianta-afide, negli ultimi anni, diversi gruppi si sono occupati dello studio dei cambiamenti dell'espressione genica indotta dall'attacco dell'afide tramite approcci "omici", in diverse interazioni pianta-insetto (Kessler and Baldwin 2002; Kuhn and Schaller 2004; Giri et al. 2006; Lippert et al. 2007). Gli studi trascrittomici, permettendo la simultanea analisi di molti geni, hanno evidenziato una vasta riprogrammazione del profilo trascrizionale della pianta ampliando, da un lato, le nostre conoscenze circa i meccanismi di difesa utilizzati dalla pianta contro gli afidi e mettendo in evidenza, dall'altro lato, le differenze e similarità che possono intercorrere tra le diverse interazioni pianta-afide (Thompson e Goggin, 2006; Smith e Boyko, 2006). È sempre più chiaro, tuttavia, che i cambiamenti a livello del trascrittoma non possono essere direttamente predittivi dei cambiamenti che si verificano a livello proteico (Hack, 2004). Per questo motivo, per ottenere una dettagliata comprensione dell'interazione pianta-insetto fitomizo, può essere d'aiuto un'integrazione tra l'approccio trascrittomico e quello proteomico così da evidenziare e analizzare dei livelli di complessità maggiori tra queste interazioni (Walling 2000; Hahlbrock et al., 2003).

### 6.1 L'attacco dell'afide *M. euphorbiae* provoca un'ampia riprogrammazione trascrizionale in pomodoro

Uno degli insetti dannosi di notevole interesse economico è l'afide della patata *Macrosiphum euphorbiae*, il quale rappresenta una delle maggiori fonti di stress biotico per il pomodoro coltivato (McKinley et al. 1992; Walgenbach, 1997). I sintomi dell'attacco del *M. euphorbiae* includono l'arricciamento fogliare, il deperimento dei germogli e la necrosi e clorosi delle foglie. Oltre il danno diretto, *M. euphorbiae* può causare la trasmissione di oltre una cinquantina di virus alle coltivazioni di pomodoro (Ng e Perry, 2004).

I cambiamenti trascrizionali indotti in pomodoro in seguito all'attacco dell'afide *M. euphorbiae* e i meccanismi molecolari associati con lo sviluppo dei sintomi sono attualmente in gran parte inesplorati, pertanto investigare quali sono le basi dei meccanismi di difesa messi in atto dalla pianta potrebbe aiutare nell'identificazione di geni che svolgono un ruolo chiave nella difesa. Inoltre, determinare i tempi della risposta difensiva di una pianta è un punto critico. Quando gli afidi attaccano una pianta ospite, essi penetrano i tessuti intercellulari mediante il loro apparato pungente succhiatore, lo stiletto, e si alimentano dei nutrienti traslocati all'interno dei fasci floematici. Una volta che il sito di alimentazione è stato stabilito, l'afide può continuare ad alimentarsi dallo stesso sito per molti giorni. Di conseguenza, le piante, devono mettere in atto delle risposte di difesa rapide e di lunga durata, poiché l'attivazione di una risposta precoce rende capace la pianta ospite di contrastare l'attacco da parte dell'afide.



Nel presente lavoro di tesi è stata condotta un'analisi trascrittomico, mediante microarray, su foglie raccolte da piante di pomodoro, MicroTom, a 24, 48 e 96 ore dall'infestazione con l'afide *Macrosiphum euphorbiae* e un'analisi proteomica su materiale raccolto 48h in seguito all'attacco dell'afide. Sono stati identificati una serie di geni e proteine la cui espressione/accumulo cambia significativamente in risposta all'attacco di *M. euphorbiae*.

L'analisi trascrizionale ha identificato un totale di 899 geni differenzialmente espressi nelle piante di pomodoro durante i tre tempi infestazione, con un numero di geni deregolati a 48h più rilevante. L'alto numero di geni differenzialmente espressi trova riscontro anche in altri studi in cui è stata osservata un'ampia regolazione trascrizionale dopo attacco dell'afide (De Vos et al., 2005; Kempema et al., 2007, Gutsche et al., 2009), suggerendo che nonostante i limitati danni meccanici subiti, le piante sono in grado di riconoscere e attivare risposte metaboliche e trascrizionali contro gli attacchi degli insetti fitomizi. Molti dei geni differenzialmente espressi sono stati annotati nella categoria funzionale concernente le risposte di difesa a stress di tipo biotico e abiotico, la trasduzione del segnale, la modificazione della parete cellulare, il metabolismo primario e secondario della pianta.

### **6.1.1 Il ruolo delle specie reattive dell'ossigeno e del calcio come molecole segnale nell'attivazione delle risposte ad afidi in pomodoro**

Una caratteristica comune di piante sottoposte ad uno stress è l'induzione di geni associati agli stress ossidativi, infatti, le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la trasduzione del segnale mediata dai fitormoni sono una componente essenziale nel crosstalk dei pathway che portano la pianta a rispondere a diversi segnali provenienti dall'esterno (Fujita et al., 2006). Pertanto non sorprende che tali molecole reattive partecipino nelle risposte della pianta all'attacco di insetti erbivori, tra cui gli afidi. Si suppone che gli elicitori degli stress ossidativi prodotti dagli afidi possano essere presenti nelle secrezioni salivari rilasciate dall'insetto durante la fase di alimentazione (Tjallingii, 2006) o che siano rappresentati dai frammenti della parete cellulare e gli oligosaccaridi che sono prodotti dal danno meccanico conseguente la penetrazione dello stiletto (Moran et al., 2002). Nel nostro studio, diversi geni codificanti per enzimi quali perossidasi e il NADPH ossidasi, correlati al metabolismo di queste molecole reattive risultano essere indotti non prima delle 48h dall'infestazione, suggerendo un alterazione dello stato redox della cellula conseguente il danno provocato dall'alimentazione dell'afide. Similmente, Kusnierczyk et al. (2008), mediante un saggio di colorazione con il 3,3'-diaminobenzidine (DAB), non hanno evidenziato un accumulo di ROS in piante di *Arabidopsis* non prima di 48h dall'infestazione con l'afide *B. brassicae*. La loro sottoespressione consentirebbe il mantenimento di alti livelli di ROS all'interno della cellula. Tra i geni up regolati, a 48h, è da segnalare *Respiratory burst oxidase homolog protein D (RBOHD)* il quale codifica per l'enzima NADPH ossidasi, il principale responsabile della produzione di ROS (in particolare di  $H_2O_2$ ), in pianta conseguente l'attacco di agenti patogeni, danno da ferita e attacco di erbivori (Torres e Dangl, 2005; Orozco-Cardenas et al., 2001). Mutanti di *Arabidopsis* per il gene *rbohD*, in cui l'accumulo di ROS è fortemente ridotto (Davletova et al. 2005) sostengono approssimativamente un tasso di crescita dell'afide *M. persicae* quattro volte maggiore rispetto alle piante controllo. Tali esperimenti dimostrano il ruolo chiave nel regolare le risposte di difesa ad afidi (Kerchev et al., 2011). L'induzione di tale gene in seguito al danno provocato dall'attacco dell'afide *B. brassicae* è stato osservato anche in piante di *Arabidopsis* (Kusnierczyk et al., 2008).

Inoltre, in seguito all'attacco di *M. euphorbiae* sono stati indotti, a differenti livelli, geni codificanti per diverse classi di perossidasi. Tali enzimi sono classificati generalmente come enzimi antiossidanti perché utilizzano come substrato-accettore di elettroni,  $H_2O_2$ , ma nello stesso tempo, in alcune occasioni, possono catalizzare la produzione di ROS in seguito all'ossidazione di diversi composti aromatici. Attualmente, un crescente numero di studi stanno confermando il ruolo di questi enzimi nella trasduzione del segnale ossidativo che determina il controllo dello stato redox e dei livelli di calcio nella cellula, così come l'espressione di geni di difesa (Kawano, 2003). In letteratura è stata osservata l'induzione di geni codificanti per tali enzimi perossidasi in risposta all'attacco dell'afide, in piante di grano, orzo e sedano (Boyko et al., 2006; Ni et al., 2001; Divol et al., 2005). Inoltre, piante tolleranti di orzo, in risposta all'attacco dell'afide *Diuraphis noxia* mostravano dei livelli di espressione maggiore dei geni codificanti per le perossidasi rispetto alle piante suscettibili suggerendo che alti livelli di tali geni in pianta possono avere un ruolo nella resistenza ad afidi (Gutsche et al., 2009).

Tuttavia, il controllo dell'omeostasi redox è di fondamentale importanza per il metabolismo cellulare, poiché i ROS a bassi livelli possono agire come molecole segnale in processi biologici quali lo sviluppo e le risposte agli stress, ma a livelli più elevati possono causare un danno ossidativo alla cellula, mediante l'ossidazione di macromolecole, come proteine, lipidi e acidi nucleici (Mittler et al., 2004). Pertanto non sorprende che i dati riportati in questo lavoro hanno indicato l'induzione di diversi geni che codificano per proteine antiossidanti in grado di sequestrare i composti reattivi che sono prodotti dal danno meccanico, quali *glutaredoxin* e la *glutathione-s-transferase*. Le glutathione-s-transferasi sono una classe di enzimi che partecipano in diversi processi biologici, sia del metabolismo primario che secondario della pianta, e nella traduzione del segnale (Dixon et al., 2002). Questi enzimi possono svolgere un ruolo nel bilanciamento dello stato ossidativo della cellula in quanto le molecole di glutathione ridotte hanno un potere redox tamponante, che può conferire protezione alla cellula contro questo tipo di stress (Ogawa, 2005). L'induzione del gene *glutathione s-transferase* è stato associato alle risposte di difesa all'afide *S. graminum* in piante resistenti di sorgo (Park et al., 2006). L'altra classe di enzimi antiossidanti sono le glutaredoxine, codificate da una famiglia multigenica in pianta, che giocano un ruolo diretto nel sistema antiossidante della cellula e sembrano essere coinvolte nella pathway di segnale dell'acido salicilico (Rouhier et al., 2008). Infatti, tale enzima agisce riducendo i ponti disolfuro esistenti tra i monomeri della proteina NPR1, una proteina regolatrice della resistenza sistemica acquisita in pianta mediata dall'acido salicilico, con conseguente accumulo di questa proteina nel nucleo e interazione con i fattori di trascrizione responsabili dell'espressione dei geni PR (Mou et al., 2003). Una forte induzione di tale geni è stata osservata anche in risposta all'attacco di *Bemisia tabaci* in piante di *Arabidopsis* (Kempema et al., 2006). Nel nostro caso, a 48h si osserva inoltre, l'induzione di geni che codificano per proteine coinvolte nella protezione dagli stress ossidativi, quali *aldehyde dehydrogenase*, *aldo keto reductase* e *alpha-dioxygenase2*. L'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi ad opera delle specie reattive dell'ossigeno può determinare la formazione dei lipidi perossidati che possono essere degradati, enzimaticamente o non, in aldeidi tossiche (Mano et al., 2002). La detossificazione dei composti aldeidici tossici può avvenire mediante riduzione ad alcoli per opera dell'enzima aldo-cheto reductasi (Burczynski et al., 2001) o acidi carbossilici mediante l'azione dell'enzima aldeide-deidrogenasi (Sunkar et al., 2003), pertanto tali enzimi sembrano svolgere un ruolo centrale nella risposte della pianta agli stress ossidativi. Il gene *alpha-*

*dioxygenase* ( $\alpha$ -DOX) codifica per un enzima che catalizza lo step iniziale nella biosintesi delle oxilipine, metaboliti derivanti dagli acidi grassi polinsaturi che giocano un ruolo nella difesa dei tessuti dagli stress ossidativi (Tirajoh et al., 2005) così come nelle risposte contro agenti patogeni e insetti erbivori (Prost et al., 2005). L'induzione di tali geni, quali aldo-cheto reduttasi, aldeide-dedrogenasi, potrebbe rappresentare un tentativo della pianta di pomodoro di far fronte al danno ossidativo derivante dagli alti livelli di  $H_2O_2$  nella cellula.

Oltre alla produzione dei ROS, il danno delle membrane cellulari porta ad un aumento improvviso del calcio citosolico, normalmente presente a bassi livelli. Tale molecola gioca un ruolo fisiologico molto importante sia come messaggero secondario per l'attivazione della trasduzione del segnale sia per il mantenimento dell'omeostasi cellulare durante l'interazione pianta-insetto (Maffei et al., 2007). Infatti, in diversi sistemi di interazioni pianta-afide, ad esempio *Diuraphis noxia*-grano e *Myzus persicae*-*Arabidopsis*, è stata osservata l'induzione di proteine di legame al calcio, quali le calmoduline, CDPK, coinvolte nella trasduzione del segnale nelle risposte di difesa della pianta (Smith e Boyko, 2006). Anche nel presente lavoro, geni codificanti per proteine di legame al calcio, quali *Calcium dependent protein kinase*, *Calmodulin-like protein*, *Calcium-binding EF-hand*, *calmodulin-binding protein* sono down regolati nella pianta di pomodoro nelle prime fasi di infestazione mentre sono indotti a 48h dall'infestazione con *M. euphorbiae*, implicando un incremento di calcio nella cellula, con conseguente attivazione di geni di risposta a tale ione. Inoltre, l'attivazione dei geni *Calcium dependent protein kinase* (CDPK) a 48h si associa con l'espressione del gene *RBOHD*, come precedentemente descritto, la cui attivazione è calcio dipendente (Maffei et al., 2007).

### **6.1.2 L'attacco di *M. euphorbiae* attiva in pomodoro pathway associati all'acido salicilico ed etilene**

È stato proposto che gli afidi possono essere percepiti dalla pianta come agenti patogeni (Walling, 2000). Tale caratteristica è giustificata in letteratura dalla somiglianza nella modalità di penetrazione della cellula vegetale tra le ife fungine e lo stiletto, e per la miscela di enzimi rilasciati durante la crescita fungina e l'alimentazione dell'afide, che potrebbero agire come elicitori (Bos et al., 2011).

Così come in altri studi di interazione pianta-afide (Boyko et al., 2006; Kempema et al., 2007), in seguito all'attacco di *M. euphorbiae*, in particolare nei primi due tempi, in pomodoro si osserva una forte regolazione di geni coinvolti nelle prime fasi di trasduzione del segnale (*Receptor-like protein kinase*, *leucine-rich repeat protein kinase*, *ser-thr-specific protein kinase-like protein*, *tir-nbs-lrr resistance protein*). Questi geni che codificano per recettori di membrana con attività chinasi, che si pensa giochino un ruolo centrale nella trasduzione del segnale extracellulare durante il riconoscimento di un'agente patogeno con conseguente attivazione dei meccanismi di difesa (Afzal et al., 2008). L'induzione di tali trascritti in seguito all'infestazione di *M. euphorbiae*, suggerisce che l'afide attiva in pomodoro una cascata di segnali che si sovrappone a quella attivata dagli agenti patogeni. L'assenza di geni codificanti per tali recettori nell'ultimo tempo di attacco, rafforza ulteriormente il concetto che il riconoscimento del danno provocato dall'afide avvenga nelle prime fasi dell'interazione. Inoltre, i dati hanno indicato che *M. euphorbiae*, determina in pomodoro la regolazione di diversi geni codificanti per le proteine MAPK e proteine chinasi, che mediano quella cascata di fosforilazioni, innescata dai ROS, che portano all'attivazione di quei fattori di trascrizione responsabili dell'espressione dei

geni di difesa (Neil et al., 2002). È noto che le proteine MAP chinasi agiscono trasferendo l'informazione all'interno della cellula eucariotica e quindi non sorprende un loro coinvolgimento nelle risposte di difesa (Nakagami et al., 2005). Inoltre la down regolazione, osservata in tale studio, del gene *protein phosphatase 2c* (il quale codifica per una proteina treonin/serin fosfatasi che agisce inattivando le proteine MAP chinasi indotte da ferita) (Keyse et al., 1998) potrebbe riflettere l'attivazione delle proteine MAP chinasi con conseguente trasduzione del segnale a valle. L'attivazione di geni codificanti per proteine chinasiche è stata osservata, anche, in piante di sorgo dopo attacco dell'afide *Schizaphis graminum* (Zhu-Salzaman et al., 2004). Inoltre, i dati hanno indicato che a seguito dell'attacco afidico sono attivati o repressi geni che codificano per proteine coinvolte nella trasduzione del segnale mediata da diversi ormoni, quali acido salicilico, acido giasmonico, etilene, per cui è riconosciuto un ruolo chiave nella regolazione dei pathway di segnale in cui sono coinvolti (Howe, 2004; Pozo et al., 2004; Grant e Lamb, 2006; Van Loon et al., 2006; Von Dahl e Baldwin, 2007). Inoltre, sono coinvolti anche altri ormoni quali auxine, acido abscissico, brassinosteroidi, anche essi implicati nelle risposte di difesa della pianta ma il cui ruolo è meno studiato (Mauch-Mani e Mauch, 2005; Nakashita et al., 2003; Navarro et al., 2006; Wang et al., 2007).

Nei tre tempi di infestazione, è stata osservata una forte induzione di geni indotti per azione dell'acido salicilico e correlati alla patogenesi (PR) e una più debole induzione di geni correlati al "wounding" e all'acido jasmonico. Monitorando i livelli dei geni correlati alla difesa durante l'interazione *M. persicae*-*Arabidopsis*, Moran e Thompson, (2001) hanno osservato un aumento dei trascritti regolati dall'acido salicilico, mentre i geni regolati dall'acido giasmonico erano indotti temporaneamente o a più bassi livelli. Un simile andamento è stato ottenuto anche da Martinez de Ilarduya et al., (2003) nello studio dell'interazione *M. euphorbiae*-pomodoro, infatti geni di difesa dipendenti dall'acido salicilico, quali *PR1* e *GluB*, si accumulavano a più alti livelli rispetto a geni dipendenti dall'acido giasmonico quali *Pin1* e *PinII*. Tale profilo di induzione ha trovato conferma in diversi studi trascrizionali condotti su piante di *Arabidopsis* e di sorgo (Zhu-Salzaman et al., 2004, Kempema et al., 2006; Moran et al., 2002; De Vos et al., 2005). Inoltre, Li et al. (2006) hanno evidenziato, mediante studi di mutanti, il ruolo dell'acido salicilico nella sviluppo della resistenza contro *M. euphorbiae* in piante di pomodoro. I dati riportati in questa tesi hanno indicato che, tra i geni che agiscono a valle del pathway di trasduzione dell'SA, in pomodoro risulta fortemente regolato il gene *Nimin2C*. L'induzione di questo gene è stata osservata anche in piante di *Arabidopsis* attaccate dall'afide *Brevicoryne brassicae* (Kusnierczyk et al., 2008). Tale gene codifica per una proteina in grado di interagire con NPR1 e regolare l'espressione della proteina correlata alla patogenesi, PR-1 (Weigel et al., 2001). In piante di tabacco e *Arabidopsis*, tale gene è fortemente indotto dall'acido salicilico (Weigel et al., 2001-2005; Zwicker et al., 2007). In particolare, i geni *Nimin2* di tabacco sono attivati prima del gene *PR-1a* e una over espressione determina un ritardo nell'accumulo della proteina PR-1, mentre la sottoespressione incrementa i livelli di PR-1 (Zwicker et al., 2007). Questo suggerisce che la proteina Nimin2C potrebbe regolare l'attività del complesso NPR1-fattori di trascrizione TGA determinando una repressione transiente delle proteine PR prima che la risposta SAR sia completamente sviluppata. In accordo con quanto proposto dalla letteratura, in pomodoro si è osservato l'espressione del gene *PR-1* solo nel secondo tempo di induzione, 48h, mentre l'attivazione del gene *Nimin2C* è stata osservata già nelle prime fasi.

Tra i geni dipendenti dall'acido salicilico, risultano sovraespressi anche alcuni geni *ankyrin repeat protein* che, oltre ad avere un ruolo nella SAR, sembrano essere coinvolte anche nella regolazione del metabolismo antiossidante (Yan et al., 2002). Inoltre, sia per il tempo 24h che 96h risultano regolati geni codificanti per le chitinasi, la cui induzione per esempio, è stata associata con le risposte contro *S. graminum* in piante suscettibili di sorgo (Zhu-Salzman et al. 2004).

*M. euphorbiae* induce l'espressione di geni codificanti per fattori di trascrizione indotti dall'acido salicilico, quali ad esempio *Dof-type zinc-finger domain-containing protein* e *bZIP transcription factor* che interagiscono tra di loro e determinano l'espressione dei geni correlati allo stress (Singh et al., 2002). Inoltre, l'attacco di *M. euphorbiae* stimola l'espressione dei fattori di trascrizione WRKY, così come osservato in altri studi (Voelckel et al., 2004; Park et al., 2006; Li et al., 2008; Smith et al., 2010; Kusnierczyk et al., 2008). I fattori di trascrizione WRKY contengono almeno un dominio conservato WRKY seguito da un motivo zinc-finger C2H2 (Wu et al., 2005), sono importanti regolatori delle risposte di difesa dipendenti dall'acido salicilico (Maleck et al., 2000; Wang et al., 2006) e possono limitare i pathway di segnale regolati dall'acido giasmonico (Kalde et al. 2003; Li et al. 2004; Mao et al. 2007). In pomodoro si osserva una forte induzione di tali geni, in particolare del gene *WRKY40* e *WRKY6*, fin dalle prime fasi e fino all'ultimo tempo di induzione suggerendo l'attivazione del pathway dell'acido salicilico durante tutto il tempo di infestazione della pianta con *M. euphorbiae*. L'induzione di tali fattori di trascrizione potrebbe parzialmente spiegare la ridotta espressione dei geni correlati all'acido giasmonico, di fatto molti dei geni associati alla biosintesi dell'acido giasmonico, quali *LOXD* e *fosfolipasi*, e alle risposte di difesa dipendenti da questo ormone sono sottoespressi in seguito all'attacco di *M. euphorbiae* in pomodoro. Questa sottoespressione, inoltre, rafforza l'ipotesi che dato il limitato danno meccanico procurato dagli afidi all'atto dell'alimentazione, essi siano in grado di limitare l'attivazione di quei pathway di segnale dipendenti dall'acido giasmonico. Tuttavia, *M. euphorbiae* determina l'attivazione in pomodoro di geni codificanti per gli inibitori proteasi, quali *PinI-PinII-trypsin and protease inhibitor family protein*. Infatti, gli insetti fitomizi, tra cui gli afidi, allo scopo di assorbire sufficienti quantità di aminoacidi ingeriscono grandi quantità di succo floematico. Alcune proteine floematiche, quali lectine e inibitori di proteasi, con azione antinutritiva o tossica per l'insetto, sono potenziali agenti della difesa diretta della pianta, anche contro gli insetti fitomizi (Murdock e Shade, 2002). Tale induzione trova conferma in altri studi di interazione pianta-afide condotti in piante di *Arabidopsis* e orzo (Kusnierczyk et al. 2008, Delp et al., 2009). Inoltre, in pomodoro, è stata osservata un'espressione precoce e transiente degli inibitori di proteasi Pin I e Pin II dopo attacco sia dell'afide *M. euphorbiae* sia *M. persicae* (Martinez de Ilarduya et al., 2003). Oltre l'attivazione degli inibitori di proteasi, in questo studio la pianta di pomodoro attiva l'espressione dei geni *leucine aminopeptidase* e *arginase*. Entrambi sono classicamente coinvolti nelle risposte di difesa contro gli insetti masticatori (Pautot et al., 1993; Chen et al., 2004-2005). Questi due enzimi agiscono in sinergia andando a ridurre il valore nutrizionale delle proteine ingerite dall'insetto, in quanto la proteina leucina aminopeptidasi rimuove i residui di arginina (un aminoacido essenziale per gli insetti) dalla catena polipeptidica mentre l'arginasi degrada enzimaticamente tale aminoacido (Chen., 2008).

I nostri dati hanno indicato che l'attacco di *M. euphorbiae* induce in pomodoro la regolazione di geni coinvolti nella biosintesi e nella percezione dell'etilene. Infatti, è stata osservata l'induzione del gene *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* che codifica per un'enzima chiave nella biosintesi dell'etilene (Vriezen et al., 1999), e di

diversi geni codificanti per proteine di risposta a tale ormone, quali recettori e fattori di trascrizione. In particolare tra i geni up regolati è presente il gene *ERF/AP2 transcription factor* (ERF1), il quale codifica per un fattore di trascrizione che influenza la regolazione dei geni indotti dall'acido giasmonico e si pensa che possa agire come integratore nelle risposte mediate dall'ET e l'JA (Lorenzo et al., 2003). Inoltre i fattori di trascrizione AP2/ERF possono interagire con alcuni elementi in cis, GCC box, presenti nei promotori dei geni PR (Singh et al., 2002), determinandone l'attivazione, pertanto l'espressione di tali geni in pomodoro potrebbe agire in maniera sinergica aumentando alcune risposte dipendenti dall'acido salicilico e giasmonico. Inoltre, in alcuni studi è stato osservato un possibile effetto di soppressione dei geni indotti dall'acido giasmonico ad opera dell'etilene (Zhu-Salzman et al., 1998; Rojo et al., 1998; Winz e Baldwin, 2001).

Tra i geni coinvolti nel metabolismo degli ormoni è interessante l'upregolazione del gene *sterol delta-7 reductase*, similmente con quanto osservato anche in piante di grano dopo attacco dell'afide *Diuraphis noxia* (Boyko et al., 2006). Tale gene catalizza lo step finale nella sintesi dei precursori dei brassinosteroidi, il che fa ipotizzare ad un ruolo di tale ormone nelle risposte di difesa del pomodoro contro *M. euphorbiae*. Tale ipotesi è anche supportata dall'espressione del gene, *shaggy-like protein kinase*, codificante per recettori che mediano il pathway di trasduzione del segnale di tale ormone (Li et al., 2002). Studi recenti hanno stabilito un ruolo degli ormoni brassinosteroidi non soltanto nei processi di crescita ma anche nell'incrementare la resistenza della pianta verso un ampio range di stress, come alte e basse temperature, salinità e attacco di agenti patogeni. Tale effetto è probabilmente dovuto alla presenza di un cross-talk tra i brassinosteroidi e altri ormoni, come acido giasmonico e etilene (Krishna, 2003).

Gli insetti erbivori sono in grado di causare un profilo trascrizionale che si sovrappone in parte con quello relativo alle risposte agli stress abiotici (Park et al 2006; Gutsche et al., 2009). I nostri risultati indicano che tale caratteristica si osserva anche in pomodoro in seguito all'attacco di *M. euphorbiae*. Ad esempio sono indotti in pianta geni codificanti per proteine di risposta agli stress termici, come *heat shock transcription factor* e *DnaJ-like heat shock protein*. La regolazione di tali geni da parte della pianta potrebbe agire a diversi livelli sia per assicurare l'omeostasi cellulare sia per favorire la stabilità delle proteine durante lo stress a cui è sottoposta la pianta.

### **6.1.3 La duplice regolazione dei geni associati alla modificazione della parete cellulare**

L'annotazione funzionale dei geni differenzialmente espressi dopo attacco dell'afide *M. euphorbiae* ha indicato che diversi geni sono coinvolti nel processo di rimodellamento della parete cellulare suggerendo un coinvolgimento di tali modifiche nelle risposte di difesa. Le modificazioni a carico della parete cellulare sono molto frequenti in risposta all'attacco di agenti patogeni (Schenk et al., 2003) e di insetti fitofagi (Voelckel e Baldwin, 2003) e sono di solito associate ad un rafforzamento delle barriere extracellulari o al rilascio di molecole segnale (Esquerre-Tugaye et al., 2000; Vorwerk et al., 2004). Tuttavia, alcuni studi hanno evidenziato che simili cambiamenti possono verificarsi anche durante lo stabilirsi delle interazioni pianta-afide (Divol et al., 2005; Park et al., 2006; Couldridge et al., 2007; Kempema 2007; Kusnierczyk et al., 2008; Gutsche et al., 2010).

Il presente studio trascrizionale ha indicato l'up regolazione del gene *NAC-domain*, la cui espressione è stata osservata anche in *Arabidopsis* dopo attacco dell'afide *M. persicae* (Couldridge et al., 2007). Tale gene codifica per un fattore di trascrizione che, oltre ad essere coinvolto in un ampio range di risposte a stress di tipo biotico e abiotico, sembra partecipare come elemento chiave nell'attivazione del processo di sintesi della parete cellulare (Zhong et al., 2008). Inoltre, già nelle prime fasi di attacco, è osservata l'espressione di geni coinvolti nel rafforzamento della parete cellulare quali *Cellulose synthase-like C5*, upregolato in seguito a trattamento con metilgiasmonato in piante di sorgo (Schenk et al., 2000) e *proline rich protein*, proteine strutturali della parete cellulare e coinvolti nel rafforzamento di tale barriera (Vignols et al., 1999), mentre è down regolato un gene, *Alpha-L-fucosidase 2*, in grado di agire a livello dei xiloglucani di parete determinando la degradazione (de la Torre et al., 2002). A 48h molti dei geni che codificano per enzimi che influenzano l'integrità della componente strutturale della parete cellulare quali pectine, poligalatturonani, polisaccaridi sono sottoespressi. Inoltre anche geni, quali *expansin*, che codificano per proteine di cui è noto un ruolo nella rapida estensione e distensione della parete cellulare in risposta agli stress (Cosgrove, 2005) sono down regolati, in accordo con quanto riportato da Kempema et al. (2007). Anche diversi geni che codificano per enzimi coinvolti nella formazione e nella strutturazione della parete cellulare risultano sottoespressi, così come proteine coinvolte nel rafforzamento della parete cellulare, quali *Extensin* e *Hydroxyproline-rich glycoprotein*. Entrambe queste proteine sono componenti della parete cellulare e possono esistere in due forme, solubili nel simplasto e insolubili nell'apoplasto. L'insolubilizzazione, attivata dalle risposte ossidative conseguenti uno stress, determina la formazioni di legami tra queste proteine, un importante processo per fortificare la parete e contribuire alla risposte di difesa (Deepak et al., 2010). Inoltre, geni codificanti per enzimi coinvolti nella sintesi dei fenilpropanoidi, tra cui il gene *trans-caffeoyl-coa 3-o-methyltransferase-like protein* che codifica per un enzima che partecipa nel processo di lignificazione della parete cellulare (Morreel et al., 2004) è fortemente sottoespresso. Tale dato contrasta con quanto osservato in altri studi, in cui l'attacco degli afidi *Diuraphis noxia* e *Schizaphis graminum* determinava l'attivazione di tale gene in piante di orzo e sorgo, rispettivamente (Gutshe et al., 2009; Park et al., 2006). Questa duplice regolazione che si osserva in pomodoro, cioè la sottoespressione di geni coinvolti sia nella degradazione che nel rafforzamento della parete cellulare può essere vista come un tentativo della pianta da un lato di impedire la penetrazione dell'afide, opponendo una barriera quale la parete cellulare e dall'altro lato come un strategia messa in messa in atto dall'afide in grado di manipolare la risposta della pianta con lo scopo di facilitare la sua alimentazione (Giordanengo et al., 2010). Da questo punto di vista, interessante è la sottoespressione del gene *Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 5 (Gns5)*, il quale codifica per un enzima che catalizza l'idrolisi dei legami 1,3 beta-glucosil delle molecole 1,3 beta glucani e sembra giocare un importante ruolo nella decomposizione del callosio. Infatti, tra le prime risposte che si osservano in pianta in seguito al danno procurato dalla penetrazione dello stiletto dell'afide è l'occlusione dei vasi floematici, mediante la deposizione di callosio, onde prevenire la perdita del succo floematico (Furch et al., 2007). La mancata espressione del gene *Gns5* consentirebbe alla pianta di mantenere occlusi i vasi floematici impedendo l'ingestione del floema da parte dell'afide. Una simile sottoespressione è stata osservata anche in piante resistenti di riso dopo attacco dell'afide *Nilaparvata lugens* (Wei et al., 2009).

#### 6.1.4 L'afide *M. euphorbiae* altera il metabolismo primario e secondario della pianta di pomodoro

Oltre i cambiamenti a livello dei geni correlati alle risposte di difesa, l'analisi trascrizionale ha evidenziato l'alterazione dell'espressione di geni associati al turnover proteico (ad esempio proteasi), al trasporto (*aquaporin*, *lipid transfer proteins*, *ABC transporters*, *sugar transporters*, *nitrogen transporters*), così come la modulazione di geni connessi alla fotosintesi e al metabolismo primario e secondario della pianta.

Il nostro studio ha indicato una down regolazione di geni associati al processo fotosintetico, concordemente con quanto osservato in altri studi di interazione pianta-afide (Heidel and Baldwin, 2004; Zhu-Salzman et al., 2004; Voelckel et al., 2004; Qubbaj et al., 2005; Park et al., 2006). La ridotta espressione dei geni codificanti per proteine coinvolte nel processo fotosintetico, associati ad esempio, alla sintesi della clorofilla ed ai fotosistemi I e II, può essere interpretata come il tentativo della pianta di riallocare le proprie risorse dai processi di crescita e sviluppo verso una risposta di difesa inducibile efficace (Heidel e Baldwin, 2004). Inoltre, il metabolismo primario della pianta è una fonte di zuccheri, aminoacidi e lipidi, nutrienti essenziali per l'insetto, e il floema rappresenta il principale sistema di trasporto di tali nutrienti nella pianta. Gli afidi sono in grado di ingerire enormi quantità di succo floematico per assimilare sufficienti quantità di azoto, determinando un'alterazione delle relazioni *source-sink* esistenti all'interno della pianta (Douglas, 2006). Infatti, la diminuzione di zuccheri al sito di alimentazione creato dall'afide può determinare la formazione di un nuovo punto *sink* all'interno della pianta, con conseguente alterazione dell'espressione di geni coinvolti nel metabolismo e assimilazione degli zuccheri. I nostri dati trascrittomici indicano che diversi geni coinvolti nel metabolismo primario della pianta, sia ad esempio dei lipidi che dei carboidrati, risultano up e down regolati, concordemente con la formazione di un nuovo punto *sink*, rappresentato dall'afide sulla pianta. Una simile risposta a livello del metabolismo e dei geni codificanti per enzimi coinvolti nell'assimilazione dei carboidrati è stata osservata anche in piante di sedano dopo attacco dell'afide *M. persicae* (Divol et al., 2005). D'altro canto, la down regolazione di geni del metabolismo primario che è stata osservata, potrebbe essere o una strategia adottata dalla pianta per consentire il deposito temporaneo delle proprie risorse nutritive da riutilizzare successivamente o come conseguenza di un tasso fotosintetico minore. Inoltre, la down regolazione di geni associati al metabolismo lipidico, soprattutto durante il secondo tempo di induzione, potrebbe determinare un minor rilascio di acidi grassi dai lipidi di membrana con conseguente minor disponibilità di substrato per la produzione di molecole segnali quali l'acido giasmonico e ciò potrebbe in parte spiegare anche la ridotta espressione di geni correlati a tale ormone.

Oltre all'alterazione del metabolismo dei lipidi e dei carboidrati, i nostri dati hanno indicato che geni codificanti per enzimi che partecipano al metabolismo/sintesi degli aminoacidi risultano down regolati, diversamente da quanto riportato in letteratura. Ad esempio Voelckel et al. (2004) hanno osservato l'upregolazione di geni codificanti per enzimi coinvolti nella sintesi di aminoacidi dopo attacco dell'afide *Myzus nicotianae*. Inoltre anche in piante di *Arabidopsis* l'attacco dell'afide *M. persicae*, determinava l'espressione di geni associati con la biosintesi del triptofano (Moran et al. 2002). L'induzione di geni coinvolti nella biosintesi degli aminoacidi potrebbe spiegare il fenomeno di aumento del contenuto di aminoacidi osservato in risposta all'attacco dell'afide (Sandstrom et al., 2000; Gironse et al., 2003).



In pomodoro è stata osservata, comunque, l'induzione di geni codificanti per proteasi e trasportatori di tale molecole azotate, come riscontrato da Divol et al., (2005) il che può suggerire da un lato il tentativo dell'afide di migliorare il contenuto in aminoacidi essenziali del succo floematico e dall'altro lato una strategia adoperata dalla pianta per contrastare tale processo. Tale ipotesi troverebbe conferma nella downregolazione di geni codificanti per acquaporine, osservata anche dopo attacco di *Homalodisca coagulata* in piante di *Citrus sinensis* (Mozoruk et al., 2006). Le acquaporine facilitano il processo di osmosi, formando dei pori attraverso cui il passaggio di molecole d'acqua è dipendente dal gradiente del potenziale idrico della cellula (Johansson et al., 2000). E' possibile ipotizzare che una loro induzione potrebbe incrementare la concentrazioni di nutrienti nel floema, a beneficio dell'afide. La down regolazione che abbiamo osservato in pomodoro potrebbe limitare tale passaggio dei nutrienti, sia aminoacidi che zuccheri, con conseguente riduzione del valore nutrizionale del succo floematico e alimentazione dell'afide.

Per ciò che riguarda il metabolismo secondario, tra i geni upregolati sono presenti *cytochrome p450* e *cytochrome p450 monooxygenase*, geni attivati anche in altre interazioni pianta-afide (Zhu-Salzman et al., 2004; Park et al., 2006, Smith et al., 2010; Couldridge et al., 2007; Gutshe et al., 2009). Essi codificano per enzimi che mediano un ampio range di reazioni ossidative che portano alla sintesi di composti associati con la difesa e i pathway di segnale (Li et al., 2002). In pianta, il gene *cytochrome p450* sembra essere coinvolto nelle risposte di difesa mediata dall'acido giasmonico (Park et al., 2002), mentre il gene *cytochrome p450 monooxygenase* agisce nella sintesi dell'acido giasmonico, salicilico e di altri composti di difesa, quali fenilpropanoidi, terpenoidi e alcaloidi in diverse specie di piante (Collu et al., 2001). È interessante notare che la pianta deregola geni associati alla sintesi dell'acido ascorbico e della vitamina B1, e al metabolismo degli ureidi, composti ricchi in azoto, in quanto la loro sottoespressione può rappresentare, ancora una volta un tentativo della pianta di ridurre il valore nutrizionale del succo floematico. Inoltre anche diversi geni associati alla sintesi delle poliammine, composti che svolgono un'azione di protezione contro un ampio range di stress tra cui il danno ossidativo dovuto all'eccessiva generazione di specie reattive dell'ossigeno (Alcazar et al., 2006), sono sottoespressi il che potrebbe riflettere un più alto livello di tali composti nella cellula, atti ad agire contro l'attacco dell'afide o nella trasduzione del segnale. In pomodoro, in conseguenza dell'attacco di *M. euphorbiae*, sono down regolati geni che codificano per proteine coinvolte nella sintesi di metaboliti secondari, quali alcaloidi, terpenoidi, flavonoidi e fenilpropanoidi, composti che possono giocare un ruolo nella difesa contro gli insetti fitomizi. È stato osservato un simile andamento in piante di riso, il danno provocato da *Nilaparvata lugens* determinava la sottoespressione di geni coinvolti nella biosintesi di fenilpropanoidi (Cho et al., 2005).

La bassa corrispondenza ritrovata tra l'analisi trascrittomica e proteomica (tabella 5.8) trova conferma in un numero crescente di studi che combinano questi due approcci, che hanno mostrato che non sempre esiste una buona correlazione tra l'accumulo degli mRNA e delle proteine (Hack, 2004; Jiang et al., 2007; Yan et al., 2006). Il basso numero di geni e corrispondenti proteine individuate potrebbe essere associato alla metodica utilizzata per lo studio proteomico, in quanto consente di identificare le proteine più abbondanti e solubili (Belle et al. 2006).

L'abbondanza proteica è influenzata, inoltre, da numerosi fattori sia a livello post-trascrizionale che traduzionale. Ad esempio, c'è un determinato periodo di tempo che intercorre tra la trascrizione e la traduzione durante il quale gli introni sono escissi e i

trascritti trasferiti dal nucleo al citoplasma, e inoltre la traduzione può essere influenzata dalla disponibilità dei ribosomi, dei tRNA e degli aminoacidi e di altre proteine accessorie che intervengono durante questa fase. Inoltre, le proteine possono subire delle modificazioni post-traduzionale, quali glicosilazione, fosforilazione che comunque possono influenzare i livelli proteici (Olivares-Hernández et al., 2011). È interessante, comunque notare come la classificazione funzionale abbia dato una corrispondenza in alcune delle categorie in cui ricadono le diverse proteine differenzialmente espresse. Infatti, la classificazione funzionale delle 49 sequenze, corrispondenti ai singoli spot ha messo in evidenza che la maggior parte delle proteine differenzialmente espresse è coinvolta nel processo fotosintetico e metabolismo primario della pianta, nella risposta agli stress ossidativi e alcuni nella risposta di difesa. A livello proteico, l'afide *M. euphorbiae* dopo 48h dall'infestazione, determina l'attivazione di alcune proteine coinvolte nel processo fotosintetico, in particolare le proteine OEE1, OEE2 e OEE3 che costituiscono il complesso del fotosistema II che, durante il processo di fotosintesi, attraverso l'ossidazione dell'acqua aiuta a creare un gradiente di protoni utilizzato infine dall'enzima ATP sintasi per produrre energia. È possibile ipotizzare che l'energia prodotta dall'attività del fotosistema II e dell'enzima ATP-sintasi, anche esso up regolato dopo attacco dell'afide, sia trasferita dai processi di crescita alle risposte di difesa (Heidel and Baldwin, 2004). Questa ipotesi trova conferma nella downregolazione di due proteine che entrano in gioco nel processo glicolitico e nel ciclo di Calvin. Una simile risposta è stata osservata in piante di *Nicotiana attenuata* infestate con l'afide *Myzus nicotianae* (Voelckel et al. 2004). Inoltre la proteina OEE1, mostra delle proprietà simili a quelle dell'enzima tioredoxina nelle alghe verdi, ma essendo altamente conservata negli organismi fototrofi, fa supporre che possa proteggere dall'azione delle specie reattive dell'ossigeno che si formano durante stress di tipo abiotico e biotico, anche in pianta (Heide et al., 2004). L'afide *M. euphorbiae* determina, inoltre, l'espressione in pomodoro di due enzimi coinvolti nel processo di fotorespirazione, Aminomethyltransferase e Serine hydroxymethyltransferase, così come osservato in piante di sedano e di riso (Divol et al., 2005; Wei et al., 2009). In particolare, la proteina Aminomethyltransferase fa parte del complesso glicina decarbossilasi (GDC) ed insieme con l'enzima Serine hydroxymethyltransferase (SHM) promuovono la conversione della glicina prodotta nei perossisomi in serina nei mitocondri, durante il processo di fotorespirazione (Douce et al., 2001). Inoltre, Moreno et al., (2005) hanno osservato che piante mutanti per il gene *shm* erano più suscettibili all'attacco di agenti patogeni, in quanto l'accumulo eccessivo delle specie reattive dell'ossigeno contrastava le risposte di difesa della pianta atte a limitare l'infezione dell'agente patogeno stesso. Ciò supporta l'ipotesi che il processo di fotorespirazione può giocare un ruolo chiave nel meccanismo dissipativo, riducendo la produzione di ROS a livello plastidiale e moderando il danno ossidativo. L'induzione in pomodoro, osservata nei nostri dati, sia di proteine coinvolte nel processo di fotosintesi che di fotorespirazione, fa ipotizzare che da un lato la pianta produce energia che utilizza per le risposte di difesa e che dall'altro cerca di limitare i danni derivanti dalla produzione di ROS durante il processo fotosintetico (Wormuth et al., 2007) aumentando e coordinando contemporaneamente l'attività di enzimi coinvolti in entrambi i processi. Altri due proteine correlate alla fotosintesi risultano indotte in seguito all'attacco di *M. euphorbiae*, ferredoxin-1 e Mitochondrial outer membrane protein porin (VDAC). Tra i geni coinvolti nel processo fotosintetico la proteina ferredoxin-1 fa eccezione poiché risulta fortemente indotta in seguito ad attacco di patogeni. Tale induzione potrebbe riflettere un suo generale coinvolgimento nei

meccanismi di difesa. Differenti studi chiariscono questo possibile ruolo, per esempio Dayakar et al. (2003) hanno osservato che in seguito all'attacco di *Pseudomonas syringae*, la proteina ferridossina, incrementava la capacità di alcuni elicitori batterici, tra cui le proteine *harpin*, di indurre la produzione di ROS con conseguente sviluppo di una reazione di ipersensibilità. Inoltre, piante di tabacco che sovraesprimevano tale proteina, erano più resistenti all'attacco di *Pseudomonas syringae* e *Erwinia carotovora* (Huang et al. 2007). L'up regolazione del gene codificante per la ferridossina è stata, inoltre, osservata in piante di sorgo attaccate dall'afide *Toxoptera graminum* (Park et al. 2006). La proteina VDAC è una proteina della membrana esterna dei mitocondri ed è probabile che il suo coinvolgimento nelle risposte di difesa è associato alla regolazione dell'apertura dei pori di transizione mitocondriale (PTP), con conseguente rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dal mitocondrio. Una simile up regolazione di tale proteina è stata osservata in piante *N. benthamiana* dopo infezione con il batterio *P. cichorii* (Tateda et al., 2009). L'afide *M. euphorbiae* determina in pomodoro la down regolazione di proteine coinvolte sia nei processi antiossidanti della cellula sia nei meccanismi di difesa. La sottoespressione delle proteine con azione antiossidante e che hanno come target i ROS prodotti nei cloroplasti, la principale fonte di specie reattive (Apel e Hirt, 2004), consentirebbe alla pianta di mantenere dei livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maggiori tali da causare un danno all'insetto. Inoltre, i geni correlati agli stress ossidativi, non sono uniformemente regolati nei tessuti fogliari in risposta all'attacco degli insetti fitomizi. All'interno di una singola specie di pianta, gli afidi possono indurre l'espressione di alcuni enzimi antiossidanti ma sopprimerne altri (Thompson and Goggin 2006). *M. euphorbiae* induce in pomodoro, 48h dopo l'infestazione, la sottoespressione di proteine correlate alle risposte di difesa, quali ad esempio glycine-rich RNA-binding protein, putative RNA-binding protein e RNA recognition motif (RRM), similmente a quanto osservato in piante di riso a seguito dell'infestazione con *Nilaparvata lugens* (Wei et al. 2009). *M. euphorbiae*, infine, induce forti alterazioni anche a livello delle proteine coinvolte nel processo di traduzione, nel folding e turnover proteico. Durante la sintesi proteica, il fattore di elongazione TuB (EF-TuB) gioca un ruolo importante nel promuovere il legame del aminoacil-tRNA ai siti di legame dei ribosomi. Nel presente lavoro, la diminuzione dei livelli di espressione di questa proteina dopo attacco afidico suggerisce che la sintesi proteica possa essere alterata nelle foglie di pomodoro e ciò concorda con il più basso livello di espressione della Chloroplast-specific ribosomal protein. Sono state identificate due proteasi plastidiali, la proteasi FtsH, coinvolta in differenti processi cellulari quali sintesi degli organelli, la regolazione trascrizionale e la proteolisi, e la proteina DegP-serina proteasi associata alla membrana tilacoidale la cui funzione non è stata ancora esplorata, ma la sua localizzazione cellulare fa pensare che possa essere implicata nella degradazione delle proteine solubili presenti nel lumen o legati alla membrana ma con una porzione esposta nel lumen (Adam, 2000). La proteina Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (PPIase) catalizza l'isomerizzazione cis-trans del legame peptidico, ed a livello dei tilacoidi tale attività enzimatica, in condizioni riducenti, è fortemente soppressa (Shapiguzov et al., 2006). Tutte queste proteine sono sottoesprese nelle piante di pomodoro dopo attacco dell'afide *M. euphorbiae*. Normalmente, la più bassa espressione di proteine quali chaperonine e proteasi può influenzare il turnover proteico e il controllo della qualità delle proteine in ogni compartimento cellulare. Di solito, una condizione di stress può causare un cambiamento deleterio di molti enzimi e della struttura delle proteine, le quali rappresentano un estremo rischio per la cellula. Pertanto, per la sopravvivenza della cellula è molto importante sia

mantenere le proteine nella corretta conformazione funzionale onde evitare l'aggregazione di proteine non native sia rimuove polipeptidi non funzionali e potenzialmente dannosi. Perciò, la distruzione o alterazione di questo sistema di controllo potrebbe riflettere un generale stato di stress a cui è sottoposta la pianta di pomodoro dopo attacco afidico.

## 6.2 Un modello della risposta del pomodoro a *M. euphorbiae*

Sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi è stato sviluppato un modello che vuole riassumere gli effetti dell'attacco afidico sui principali pathway molecolari del pomodoro (figura 6.1).

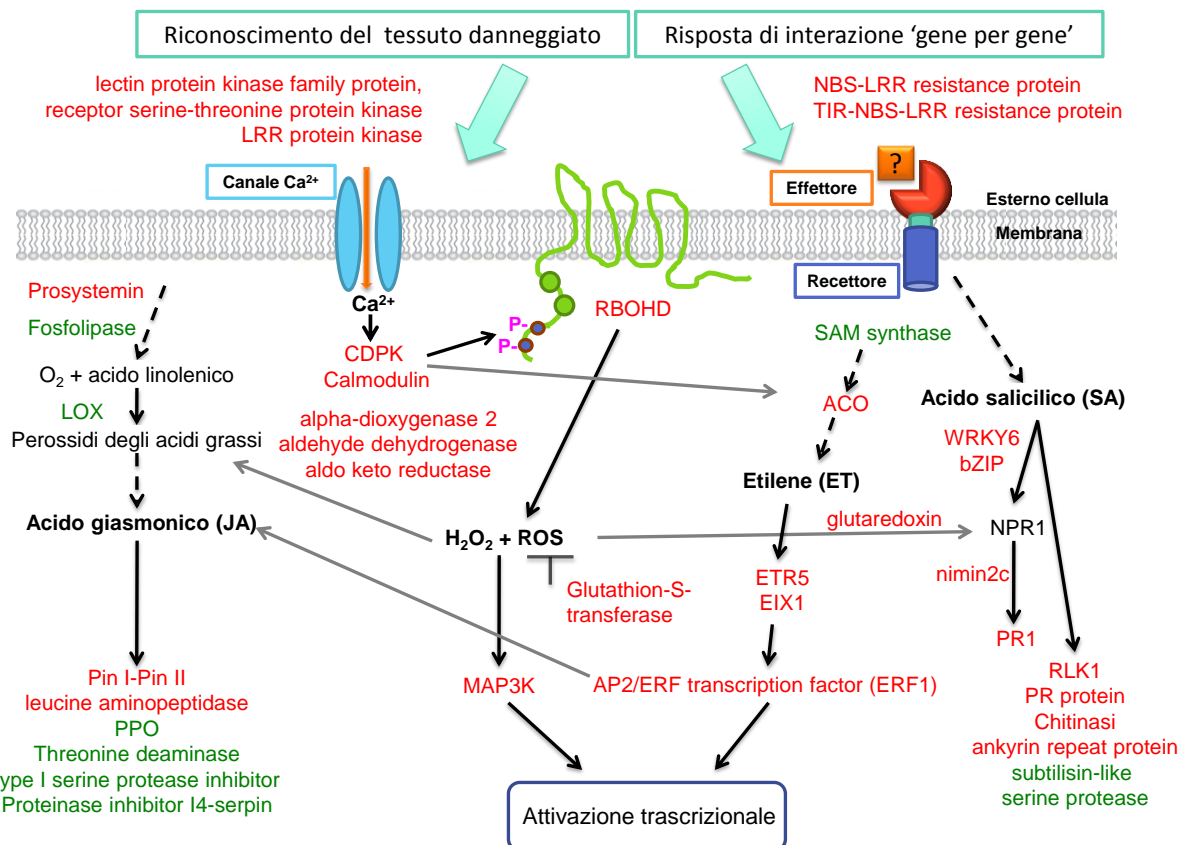


Figura 6.1: Modello riassuntivo della risposta del pomodoro a *M. euphorbiae*. La pianta percepisce l'afide sia in base al danno del tessuto vegetale e sia mediante l'interazione tra recettori ed effettori ancora non noti. Tale percezione attiva geni coinvolti nella produzione di molecole segnale associate agli stress ossidativi ( $H_2O_2$  e ROS) e agli incrementi di calcio citosolico. Inoltre, sono attivati geni correlati ai pathway di difesa dipendenti dall'acido salicilico, acido giasmonico ed etilene. Tali pathway regolano l'attivazione di geni che codificano per proteine di difesa. In rosso e in verde sono riportati alcuni dei geni sovraespressi e sottospressi dall'analisi trascrittomico, rispettivamente, le cui funzioni sono dettagliate nelle discussioni. In grassetto sono riportate le principali molecole segnale coinvolte nei pathway di difesa del pomodoro all'afide. La freccia tratteggiata (--->) indica l'abbreviazione dei pathway di biosintesi; la freccia continua (→) indica un'influenza diretta delle molecole di difesa; la freccia grigia (→) indica un'influenza indiretta delle molecole di difesa; Il simbolo ⊥ indica un'influenza negativa.

Brevemente, conseguentemente l'attacco dell'afide, la pianta sovraesprime geni che codificano per proteine con un dominio chinasi, che agiscono da recettori, così come geni che codificano per proteine con un dominio NBS-LRR, tipico dei prodotti dei geni di resistenza, suggerendo che il pomodoro percepisce l'afide sia tramite il

danno diretto causato durante la fase di probing, sia per attivazione di una risposta di interazione “gene per gene” (Smith e Boyko, 2006). In seguito alla percezione dell'agente di danno, la pianta attiva geni coinvolti nella produzione di quelle molecole segnale che attivano le risposte di difesa della pianta. Infatti, geni codificanti per proteine di legame al calcio e per enzimi coinvolti nella sintesi delle specie reattive dell'ossigeno risultano sovraespressi indicando che queste molecole possano agire come messaggeri durante le prime fasi di trasduzione del segnale di difesa. Inoltre, in pomodoro l'afide induce l'espressione di geni codificanti per enzimi con azione antiossidante suggerendo un possibile tentativo messo in atto dalla pianta per proteggersi dal possibile danno derivante dagli alti livelli delle molecole reattive. Durante i tre tempi di infestazione, sono indotti geni coinvolti nel pathway di segnale dell'acido salicilico e geni di difesa dipendenti dall'acido salicilico così come geni associati al pathway dell'etilene. Il pathway di risposta a ferita indotto dall'acido giasmonico, risulta meno ricettivo, infatti geni che codificano per enzimi del pathway di biosintesi di tale ormone risultano down regolati e proteine con azione anti nutritiva, dipendenti dall'acido giasmonico, sono up e down regolate. Tale modello mostra un overview dei possibili pathway di difesa attivati in pomodoro in conseguenza dell'attacco di *M. euphorbiae* e dei possibili cross talk esistenti tra tali pathway.

### **6.3 La pianta di pomodoro come mediatore nell'interazione tra l'afide *M. persicae* e l'insetto terricolo *A. lineatus***

La pianta, quando percepisce l'attacco da parte di un organismo, attiva una risposta di difesa che determina la regolazione di geni associati con la produzione di molecole/metaboliti con azione difensiva. Molto del lavoro, sullo studio delle risposte di difesa indotte, ha riguardato solo la parte aerea della pianta e le risposte indotte da un'unica specie di attacco (van der Putten et al., 2001). Tuttavia, l'induzione delle risposte di difesa può interessare l'intera pianta e attacchi a livello radicale possono indurre cambiamenti nel sistema dei germogli e viceversa (Bezemer e Van Dam, 2005). Le piante possono essere esposte ad attacchi multipli da parte sia di organismi del suolo che della parte aerea. Se si vuole ottenere un quadro più profondo delle risposte di difesa attivate in pianta in un agro-ecosistema, bisogna quindi tener presente le interazioni che possono intercorrere tra i diversi agenti di danno (Dicke e Hilker, 2003). C'è un crescente interesse nello studio dell'effetto sistemico delle risposte di difesa indotte dagli insetti terricoli sugli organismi della parte aerea, e su quali siano i cambiamenti a livello molecolare che regolano queste interazioni, in quanto la pianta potrebbe integrare tali segnali di difesa e utilizzarli contro i vari organismi di attacco (Bruce e Pickett, 2007). Nel presente studio è stato esaminato come la performance dell'afide *M. persicae* sia influenzata dalla presenza di larve dell'insetto terricolo *A. lineatus*, quando entrambi condividono la stessa pianta. È stato evidenziato un effetto negativo sulla performance dell'afide, quando fatto crescere su piante precedentemente sottoposte al danno provocato a livello radicale da *Agriotes*, indicato da un incremento significativo del tempo di sviluppo, da una diminuzione della fecondità e da una riduzione ponderali degli afidi. In letteratura sono riportati studi in cui si osservava sia un'influenza positiva, negativa che neutrale della presenza dell'insetto terricolo sulla performance dell'afide. Ad esempio è stato osservato un miglioramento della performance dell'afide *Aphis fabae* quando fatto crescere su piante attaccate da larve di *Phyllopertha horticola* (Gange e Brown, 1989). Così come, in piante di *Sinapsis arvensis*, la presenza dell'elateride aveva un

effetto positivo sullo sviluppo dell'afide, probabilmente associato a cambiamenti nell'assorbimento dell'acqua e nella concentrazione di azoto nel floema (Poveda et al., 2005). È stata osservata, invece, una riduzione della performance dell'afide *Rhopalosiphum padi* quando contemporaneamente erano presenti anche nematodi (Bezemer et al., 2005). Infine, la presenza dell'insetto terricolo *Agriotes* non determinava alcun effetto sulla performance dell'afide *Myzus persicae* quando entrambi si alimentavano su piante di *Plantago lanceolata* (Wurst et al., 2007). Una prima conclusione, quindi, è che le interazioni che si stabiliscono tra differenti specie di insetti terricoli e quelli che attaccano la parte epigea possono indurre diverse risposte, in funzione della specie vegetale e degli insetti coinvolti in queste interazioni.

Recenti evidenze hanno suggerito che gli insetti terricoli oltre a modulare la performance dell'insetto "aboveground" sono in grado di interferire anche a livelli trofici superiori, andando ad interferire e influenzare con la performance e il comportamento del nemico naturale (Wackers e Bezemer, 2003; van Dam et al., 2005; Rasmann e Turlings, 2007; Soler et al., 2007). Per verificare un possibile effetto della presenza dell'insetto terricolo sul terzo livello trofico, sono stati condotti dei saggi comportamentali con il parassitoide *Diaeretiella rapae*. Da tali saggi è emerso che il parassitoide non è in grado di discriminare tra piante di pomodoro con e senza l'insetto terricolo quando il suo ospite è presente su entrambi le piante. Tale incapacità del parassitoide di distinguere la presenza dell'insetto terricolo è giustificabile se si considera la possibilità che il blend di volatili, prodotto dalle piante su cui è presente l'ospite dell'insetto parassitoide, si sovrappone alla miscela di composti volatili rilasciati quando la pianta è attaccata da un altro insetto erbivoro (Vos et al., 2001). Attualmente sono stati condotti solo due studi circa l'attrattività dei nemici naturali da parte di piante che sono attaccate anche a livello radicale (Soler et al., 2007, Rasmann e Turlings, 2007). Soler et al., 2007, in esperimenti condotti con il parassitoide *C. glomerata* hanno mostrato come il nemico naturale effettuava un uguale numero di voli su piante su cui era presente il suo ospite ed erano attaccate e non a livello radicale. Effettuando uno studio circa i volatili prodotti, essi hanno evidenziato che tale risposta era associata alla produzione di un blend, tra le piante attaccate solo dall'insetto fogliare e le piante sottoposte anche al danno radicale, simile e in parte sovrapposto il che rendeva incapace il nemico naturale di percepire la presenza di un altro insetto fitofago. Pertanto la mancata preferenza del parassitoide *D. rapae*, potrebbe essere associata ad un sovrapposta miscela di composti volatili tra le piante sottoposte al singolo o duplice attacco. Dall'altro lato, l'assenza di scelta può essere dovuta anche ad un basso livello di danno radicale da parte di *Agriotes*, in quanto il danno provocato da tale insetto, spesso sembra essere irregolare nel tempo (Parket e Howard, 2001). Il minore livello di danno potrebbe non determinare la produzione di un blend di volatili da parte della pianta tale da determinare e influenzare la scelta del parassitoide, spiegando anche la mancata preferenza del parassitoide *D. rapae* quando gli è stata data la possibilità di scegliere tra piante attaccate solo a livello radicale verso piante controllo. Infatti, anche nello studio condotto da Soler et al., (2007) hanno evidenziato che solo le piante attaccate dall'ultimo stadio larvale dell'insetto terricolo erano in grado di influenzare la scelta del nemico naturale, producendo un blend di volatili costituito da molecole con azione repellente. Questo suggerisce che, anche se *A. lineatus* causa un danno a livello radicale, esso potrebbe non essere sufficiente da consentire al parassitoide di percepire la presenza dell'insetto terricolo.

Sono stati proposti due differenti meccanismi per spiegare le interazioni tra gli insetti “aboveground” e “belowground” mediate dalla pianta ospite. Il primo meccanismo assume che il danno provocato a livello radicale provoca una riduzione della biomassa delle radici che a sua volta determina l’attivazione di un effetto compensatorio a livello fogliare riallocando aminoacidi e carboidrati nelle foglie della pianta attaccata con incremento della performance degli insetti erbivori che si nutrono della parte aerea (Gange e Brown 1989; Masters et al., 1993). Alternativamente, l’insetto terricolo può indurre una risposta di difesa nella pianta che determina un più alto livello o una differente distribuzione dei composti di difesa nelle foglie con conseguente riduzione della performance dell’insetto *aboveground* (Bezemer et al., 2003; Van Dam et al., 2003). I dati hanno indicato che l’attacco dell’insetto terricolo *A. lineatus* non ha determinato cambiamenti significativi nella biomassa della parte aerea della pianta di pomodoro, concordemente ad altri studi in cui la presenza dell’insetto terricolo non necessariamente influenza la biomassa della parte aerea durante il biosaggio (Dunn e Frommelt, 1998; Bezemer et al., 2003). Ciò implica che il danno provocato da *Agriotes*, a livello radicale, possa aver influenzato l’afide attraverso l’induzione e l’accumulo di molecole segnale che attivano una risposta sistemica di difesa capace di influenzare *M. persicae*. Pertanto, al fine di conoscere quali network di molecole segnale entrano in gioco durante l’interazione *M.persicae*-pomodoro-*Agriotes*, sono stati investigati i livelli di espressione di alcuni geni selezionati dall’analisi trascrittomica sulla base del loro ruolo nelle risposte di difesa della pianta contro stress biotici e in risposta a ferita. Sono stati monitorati, inoltre, i livelli di espressione di un gene dipendente dall’ABA, in quanto è stato ipotizzato che l’attacco da parte dell’insetto terricolo determini uno stress idrico a livello radicale con conseguente accumulo di ABA (Erb et al., 2011). L’ABA, infatti, oltre a giocare un ruolo chiave nella tolleranza agli stress abiotici, può agire come segnale sistemico dalle radici ai germogli (Jackson, 1997). Lo studio trascrizionale condotto su foglie distali di piante sottoposte all’azione individuale o combinata degli insetti del suolo e della parte aerea a 24h, 48h e 8 giorni dall’inoculo, ha dimostrato che, a livello sistemico, soprattutto nelle prime fasi di induzione, la pianta percepisce e risponde all’attacco dell’afide attivando geni correlati al pathway dell’acido salicilico mentre l’espressione dei geni associati con i pathway dell’acido giasmonico, etilene ed acido abscissico non risulta influenzata, come osservato da Rodriguez et al. (2010). Tali dati suggeriscono che dato il danno limitato provocato dall’alimentazione dell’afide, non è in grado di indurre significativi cambiamenti sistemici a livello molecolare. Dall’altro lato con il progredire della risposta, da 24h fino a 8 giorni, la presenza dell’insetto terricolo induce l’espressione di geni di difesa nelle foglie, indicando una regolazione sistemica dei segnali di difesa. Inoltre in risposta al danno provocato sia a livello radicale che fogliare, i livelli di espressione dei geni analizzati mostrano un profilo di espressione più simile o maggiore se comparato alle piante sottoposte al solo attacco dell’insetto terricolo. Infatti sia in presenza del solo insetto terricolo che di entrambi gli agenti di danno, i geni associati al pathway dell’acido giasmonico e dell’etilene sono sovraespressi, con un livello di espressione maggiore a 48h, per poi restare indotti fino all’ultimo tempo di infestazione ma con dei livelli di espressione minore, indicando l’attivazione di una risposta dinamica nella pianta. È stata osservata inoltre l’espressione di geni associati al pathway dell’acido salicilico, ma con un trend di induzione opposto rispetto agli altri geni oggetto di studio, in quanto dopo 48h subiscono un decremento per poi tornare ad essere espressi a livelli maggiori dopo 8 giorni. Questo differente andamento osservato tra i geni dipendenti dall’acido giasmonico e dell’acido salicilico potrebbe riflettere l’azione

antagonista esercitata da queste due molecole di difesa l'una rispetto all'altra (Pieterse et al., 2001), in quanto la maggiore espressione nel secondo tempo di infestazione di geni associati al pathway dell'acido giasmonico potrebbe determinare un'attenuazione nei livelli di espressione dei geni-SA dipendenti.

I geni dipendenti dall'JA, quali *treonina deaminasi* (TD) e l'*inibitore di proteasi II* (InhII) mostrano i livelli di espressione maggiore. Tali geni codificano per proteine con azione antinutritiva. Come è noto, gli inibitori di proteasi possono ridurre l'accesso ad aminoacidi essenziali da parte dell'insetto, mediante la formazione di complessi stabili con le proteasi impedendo la degradazione proteica e, in alcuni casi, possono ridurre la performance dell'afide (Zhu-salzman et al., 2008; Rahbé et al., 2003). Dall'altro lato l'enzima treonina deaminasi è in grado di alterare i processi digestivi dell'insetto degradando aminoacidi essenziali per l'erbivoro (Chen et al., 2005), probabilmente agendo in sinergia con gli inibitori di proteasi. È stato, inoltre, osservato che applicazioni di acido giasmonico su piante di pomodoro, inducono una risposta di difesa sistemica con conseguente impatto negativo sulla performance dell'afide *M. euphorbiae* (Cooper e Goggin, 2005). È interessante, inoltre, l'espressione del gene *Dehydrin*, sia in presenza del solo insetto terricolo che dopo duplice attacco, i cui trascritti si accumulano dopo trattamento con l'ormone ABA (Borovskii et al., 2002). L'espressione di tale gene è stata osservata anche in piante di mais dopo attacco del coleottero *D.v.virgifera* e *S. littoralis* (Erb et al., 2009), in cui si osserva un accumulo sistemico e locale sia dell'acido abscissico che di trascritti dipendenti da tale ormone. Concordamente alla letteratura, i nostri dati implicano che l'ABA giochi un ruolo nel network di segnali che mediano le interazioni tra *A. lineatus* e gli afidi. Esistono evidenze che l'acido abscissico possa influenzare la resistenza contro gli insetti erbivori. Ad esempio, piante di pomodoro e di *A. thaliana* insufficienti nei livelli di ABA prodotti, erano più suscettibili all'attacco di insetti erbivori (Thaler et al., 2004; Bodenhausen et al., 2007). L'ABA è sintetizzato nelle radici e può essere trasportato ai germogli dove induce la chiusura degli stomi e l'induzione di geni di difesa (Dodd, 2003; Boudsocq e Lauriere, 2005). Inoltre, sembra che tale ormone possa agire come un regolatore positivo delle risposte di difesa dipendenti dall'acido giasmonico (Anderson et al., 2004). Questo suggerisce che lo stress provocato a livello radicale da *Agriotes*, possa indurre la produzione di ABA, come meccanismo di tolleranza messo in atto dalla pianta e che tale ormone, trasferito nelle foglie possa favorire l'induzione di geni dipendenti dall'acido giasmonico, che a loro volta svolgono un'azione dannosa a livello dell'afide mediante un'azione anti nutritiva e/o tossica.

In conclusione, il danno radicale causato da *A. lineatus* è in grado di influenzare le difese dirette della pianta, mediante una minore performance dell'afide, influenza che può essere associata alla capacità dell'insetto terricolo di alterare le difese della pianta di pomodoro, mediante l'induzione sistemica di pathway coinvolti nelle risposte di difesa della pianta contro l'afide.



## 7. CONCLUSIONI

Il presente lavoro rappresenta il primo studio “omico” sulle risposte molecolari attivate in pomodoro dopo attacco di afidi.

Il tempo e l'intensità di una risposta di difesa sono fattori importanti per la pianta, in quanto la pronta percezione dell'insetto dannoso e l'attivazione di una risposta efficace rende capace la pianta di contrastare l'afide. Lo studio trascrittomico, condotto a diversi tempi, ha consentito infatti di indagare la dinamicità delle risposte di difesa attivate e il loro progredire nel corso dell'infestazione, evidenziando l'attivazione di una risposta dinamica, con i maggiori cambiamenti dopo 48h.

L'analisi trascrittomico e proteomica hanno permesso l'identificazione di un set di geni/proteine la cui espressione/accumulo cambia significativamente in risposta all'attacco dell'afide. È stato osservato che il danno provocato dall'afide determina un'ampia riprogrammazione trascrizionale che riguarda diversi processi biologici. Il danno provocato da *M. euphorbiae* determina l'induzione di gruppi di geni agenti nelle risposte agli stress ossidativi e nelle risposte di difesa, nella trasduzione del segnale, nella sintesi di composti di difesa così come nel processo fotosintetico e nel metabolismo della pianta. Nelle prime fasi seguenti l'attacco, la pianta attiva diversi geni che codificano per recettori di membrana con attività chinasi che si pensa giochino un ruolo centrale nella trasduzione del segnale extracellulare. In seguito alla percezione dell'afide, geni coinvolti nella produzione di molecole associate agli stress ossidativi e agli incrementi di calcio citosolico, così come diversi fattori di trascrizione WRKY risultano indotti. È stata, inoltre, osservata l'induzione di geni indotti per azione dell'acido salicilico e correlati alla patogenesi (PR), mentre differenti geni correlati al “wounding” e all'acido jasmonico sono risultati up o down regolati. Recentemente sono state identificate proteine salivari dell'afide che mostrano caratteristiche comuni alle molecole effettrici degli agenti patogeni, il che fa supporre che esse possano agire come effettori dell'afide causando l'attivazione di una risposta cellulare (Bos et al, 2011). Pertanto la delucidazione mediante studi funzionali, del ruolo di alcuni geni, possibili candidati per la difesa contro *M. euphorbiae*, fornirebbe la possibilità di identificare geni target di queste molecole effettrici, ampliando le informazioni circa le risposte e i meccanismi messi in atto dal pomodoro per contrastare l'attacco dell'afide. Inoltre, l'identificazione di specifici geni che sono coinvolti nella risposte di difesa della pianta di pomodoro, fornisce un strumento utile per lo screening di altri genotipi di pomodoro, alla ricerca degli stessi geni, fornendo così dei biomarker per la selezione di materiale vegetale resistente. Inoltre, tale studio ha messo in evidenza come lo sviluppo dell'afide è influenzato negativamente dalla presenza di un altro insetto erbivoro, in particolare l'insetto terricolo *A. lineatus*, quando attacca la stessa pianta ospite, influenza che non si ripercuote sul terzo livello trofico.

Questo effetto potrebbe essere correlato anche all'attivazione di molecole di difesa causate dal danno della pianta ospite a livello radicale. Infatti, lo studio trascrittomico ha evidenziato che l'attacco di *A. lineatus*, sia agendo da solo che in presenza dell'afide, determina l'espressione sistemica di geni correlati a diversi pathway di difesa. I dati, implicano che il danno radicale causato dall'insetto terricolo è in grado di influenzare le risposte della pianta di pomodoro, mediante l'induzione sistemica di pathway coinvolti nelle risposte di difesa della pianta contro l'afide. Anche se queste molecole sono componenti importanti per la difesa della pianta quando sottoposta ad un duplice attacco, è possibile dedurre che l'aumentata resistenza della pianta coinvolge anche altri livelli di regolazione.

Questi risultati hanno un significativo valore per le nostre conoscenze circa le interazioni tra gli insetti aboveground e belowground.

Il presente studio, quindi, rappresenta un importante contributo per la successiva comprensione di specifici meccanismi di difesa del pomodoro agli afidi. Tali conoscenze, infatti, si sono rivelati utili per iniziare a capire il ruolo della pianta come mediatore tra più specie di insetti dannosi, implicando che lo studio e l'utilizzo delle difese endogene della pianta potrebbero essere alla base delle nuove strategie atte a migliorare la resistenza del pomodoro.

.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Aarts M.G.M., Keijzer C.J., Stiekema W.J., Pereira A., Molecular characterization of the *cer7* gene of *Arabidopsis* Involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility, 1995. *The Plant Cell* 7:2115-2127
- Adam Z., Chloroplast proteases: Possible regulators of gene expression?, 2000. *Biochimie* 82:647-654
- Afzal A.J., Wood A.J., Lightfoot D.A., Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinases: Roles in Signaling and Plant Defense, 2008. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:507-517
- Alborn H.T., Hansen T.V., Jones T.H., Bennett D.C., Tumlinson J.H., et al. 2007. Disulfooxy fatty acids from the American bird grasshopper *Schistocerca americana*, elicitors of plant volatiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104:12976-81
- Alborn H.T., Turlings T.C.J., Jones T.H., Stenhagen G., Loughrin J.H., Tumlinson J.H., An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion, 1997. *Science* 276, 945-949
- Alcazar R., Marco F., Cuevas J.C., Patron M., Ferrando A., Carrasco P., Tiburcio A.F., Altabella T., Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress, 2006. *Biotechnology Letters* 28:1867-1876
- Alvarez A.E., Tjallingii W.F., Garzo E., Vleeshouwers V., Dicke M., Vosman B., Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*, 2006. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 121:145-157
- Ambros V., Bartel B., Bartel D.P., Burge C.B., Carrington J.C. et al., A uniform system for microRNA annotation, 2003. *RNA* 9:277-279
- Anderson J.P., Badruzsaufaria E., Schenka P.M., Mannersa J.M., Desmonda O.J., Ehlert C., Macleana D.J., Eberta P.R., Kazan K., Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*, 2004. *The Plant Cell* 16:3460-3479
- Apel K., Hirt H., Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, 2004. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399
- Argandona V.H., Chaman M., Cardemil I., Munoz O., Zuniga G.A., Corchera L.J., Ethylene production and peroxidase activities in aphid-infested barley, 2001. *Journal of Chemical Ecology* 27:53-68
- Belle A., Tanay A., Bitincka L., Shamir R., O'Shea E.K., Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome, 2006. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103:13004-13009
- Bennet R.N., Wallsgrove R.M., Secondary Metabolites in Plant Defense-Mechanisms, 1994. *New Phytologist* 127:617-633
- Bezemer T.M., Van Dam N.M., Linking aboveground and belowground interactions via induced plant defenses, 2005. *Trends in Ecology & Evolution* 20:617-624
- Bezemer T.M., Wagenaar R., van Dam N.M., vanDer Putten W.H., Wackers F.L., Above- and below-ground terpenoid aldehyde induction in cotton, *Gossypium herbaceum*, following root and leaf injury, 2004. *Journal of Chemical Ecology* 30:53-67
- Bezemer T.M., Wagenaar R., van Dam N.M., Wackers F.L., Interactions between above- and belowground insect herbivores as mediated by the plant defense system, 2003. *Oikos* 101:555-562

- Bhattarai K.K., Xie Q.G., Pourshalimi D., Younglove T., Kaloshian I. Coi1-dependent signaling pathway is not required for Mi-1- mediated potato aphid resistance, 2007, *Molecular of Plant Microbe Interaction* 20:276-282
- Bi J.L., Felton G.W., Foliar oxidative stress and insect herbivory—primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance, 1995. *Journal of Chemical Ecology* 21:1511–30
- Bilgin D.D., Zavala J.A., Zhu J., Clough S.J., Ort D.R., Delucia E.H., Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes, 2010. *Plant, Cell and Environment* 33:1597–1613
- Bodenhause N., Reymond P., Signaling pathways controlling induced resistance to insect herbivores in *Arabidopsis*, 2007. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1406–1420
- Borovskii G.B., Stupnikova I.V., Antipina A.I., Vladimirova S.V., Voinikov V.K., Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment, 2002. *BMC Plant Biology* 2:5
- Bos J.I.B., Prince D., Pitino M., Maffei M.E., Win J., Hogenhout S.A., A Functional Genomics Approach Identifies Candidate Effectors from the Aphid Species *Myzus persicae* (Green Peach Aphid), 2011. *PLoS Genetics* 6:11
- Boter M., Ruiz-Rivero O., Abdeen A., Prat S. Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*, 2004. *Genes*
- Boudsocq M., Lauriere C., Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families, 2005. *Plant Physiology* 138:1185–1194
- Boyko E.V., Smith C.M., Thara V.K., Bruno J.M., Deng Y., Starkey S.R., Klaahsen D.L., Molecular basis of plant gene expression during aphid invasion: wheat Pto- and Pti-like sequences are involved in interactions between wheat and Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae), 2006. *Journal of Economy and Entomology* 99:1430–1445
- Bruce T.J.A., Pickett J.A., Plant defence signalling induced by biotic attacks, 2007. *Current Opinion in Plant Biology* 10:387-392
- Bruinsma M., Dicke M., Herbivore-Induced Indirect Defence: from induction mechanisms to community ecology, 2008. *Induced plant resistance to herbivory* Section I, 7-29
- Burczynski M.E., Sridhar G.R., Palackal N.T., Pennings T.M., The reactive oxygen species- and Michael acceptor-inducible human aldo-keto reductase AKRC1 reduces the  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2- nonenal to 1,4-dihydroxy-2- nonene, 2001. *Journal of Biological Chemistry* 276:2890–2897
- Caillaud C.M., Niemeyer H.M., Possible involvement of the phloem sealing system in the acceptance of a plant as host by an aphid, 1996. *Cellular and Molecular Life Science* 9:927-931
- Casteel C.L., Walling L.L., Paine T.D., Behavior and biology of the tomato psyllid, *Bactericerca cockerelli*, in response to the Mi-1.2 gene, 2006. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 121:67–72
- Chen G., Gharib T.G., Huang C.C., Taylor J.M.G., Misek D.E., Kardia S.L.R., et al., Discordant Protein and mRNA Expression in *Lung Adenocarcinomas*, 2002. *Molecular & Cellular Proteomics* 1:304-313
- Chen H., McCaig B.C., Melotto M., He S.Y., Howe G.A., Regulation of plant arginase by wounding, jasmonate, and the phytotoxin coronatine, 2004. *Journal of Biological Chemistry* 279:45998-46007

- Chen H., Wilkerson C.G., Kuchar J.A., Phinney B.S., Howe G.A. Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut, 2005. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102:19237–19242
- Chen M., Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review, 2008. *Insect Science* 15:101-114
- Cherqui A., Tjallingii W.F., Salivary proteins of aphids, a pilot study on identification, separation, and immunolocalisation, 2000. *Journal of Insect Physiology* 46:1177–86
- Chini A., Fonseca S., Fernandez G., Adie B., Chico J.M., et al., The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signaling, 2007. *Nature* 448:666–73
- Cho S.K., Jung K.W., Jeung J.U., Kang K.H., Ship K.S., You M.K., Yoo K.S., OK S.H., Shin J.S., Analysis of differentially expressed transcripts from planthopper-infested wild rice (*Oryza minuta*), 2005. *The Plant Cell Reports* 24:59–67
- Cho S.M., Shin S.H., Kim K.S., Kim Y.C., Eun M.Y., Cho B.H., Enhanced expression of a gene encoding a nucleoside diphosphate kinase 1 (OsNDPK1) in rice plants upon infection with bacterial pathogens, 2004. *Molecular Cell* 18:390-5
- Collinge D.B., Kragh K.M., Mikkelsen J.D., Nielsen K.K., Rasmussen U., Vad K., Plant chitinases, 1993. *Plant Journal* 3:31–40
- Collua G., Unvera N., Peltenburg-Loomana A.M.G., van der Heijden R., Verpoortea R., Memelin J., Geraniol 10-hydroxylase1, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis, 2001. *FEBS Letters* 508:215-220
- Conesa A., Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Talon M., Robles M., Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 2005. 21:3674-3676
- Constabel C.P., Yip L., Patton J.J., Christopher M.E., Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory, 2000. *Plant Physiology* 124: 285–296
- Cooper W.R., Goggin F.L., Effects of jasmonate-induced defenses in tomato on the potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*, 2005. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115:107–115
- Cosgrove D.J., Growth of the plant cell wall, 2005. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6:850–861
- Couldridge C., Newbury H.J., Ford-Lloyd B., Bale J., Pritchard J., Exploring plant responses to aphid feeding using a full *Arabidopsis* microarray reveals a small number of genes with significantly altered expression, 2007. *Bulletin of Entomological Research* 97:523–532
- Davletova S., Schlauch K., Coutu J., Mittler R., The zincfinger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*, 2005. *Plant Physiology* 139:847–856
- Dayakar B.V., Lin H.J., Chen C.H., Ger M.J., Lee B.H., Pai C.H., Chow D., Huang H.E., Hwang S.Y., Chung M.C., Feng T.Y., Ferredoxin from sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) intensifying harpin (pss)- mediated hypersensitive response shows an enhanced production of active oxygen species (AOS), 2003. *Plant Molecular Biology* 51:913–924
- de la Torre F., Sampedro J., Zarra I., Revilla G., AtFXG1, an *Arabidopsis* Gene Encoding  $\alpha$ -L-Fucosidase Active against Fucosylated Xyloglucan Oligosaccharides, 2002. *Plant Physiology* 128:247-255
- De Moraes C.M., Mescher M.C., Tumlinson J.H., Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females, 2001. *Nature* 410:577–80

- De Vos M., Van Oosten V.R., Van Poecke R.M.P., Van Pelt J.A., Pozo M.J., et al., Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack, 2005. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 18:923-37
- Deepak S., Shailasree S., Kini R.K., Muck A., Mithofer A., Shekar H., Shetty J., Hydroxyproline-rich Glycoproteins and Plant Defence, 2010. *Phytopathology* 158:585–593
- Degenhardt J., Gershenzon J., Baldwin I.T., Kessler A., Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies, 2003. *Current Opinion in Biotechnology* 14:169-176
- Delp G., Gradin T., Ahman I., Jonsson L.M.V., Microarray analysis of the interaction between the aphid *Rhopalosiphum padi* and host plants reveals both differences and similarities between susceptible and partially resistant barley lines, 2009. *Molecular Genetics and Genomics* 281:233–248
- Dicke M., Gols R., Ludeking D., Posthumus M.A. Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants, 1999. *Journal of Chemical Ecology* 25:1907–1922
- Dicke M., Hilker M., Induced plant defences: from molecular biology to evolutionary ecology, 2003. *Basic and Applied Ecology* 4:3–14
- Dicke M., Hilker, M. Oviposition-induced plant cues: do they arrest *Trichogramma* wasps during host location?, 2005. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115: 207–215
- Dicke M., Specificity of herbivore-induced plant defences, 1997. *Insect–Plant Interactions and Induced Plant Defence*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester
- Dicke M., van Loon J.J A, Soler R., Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack, 2009. *Nature chemical biology* 5:317-324
- Divol F., Vilaine F., Thibivilliers S., Amselem J., Palauqui J.C., Kusiak C., Dinant S., Systemic response to aphid infestation by *Myzus persicae* in the phloem of *Apium graveolens*, 2005. *Plant Molecular Biology* 57:517-540
- Dixon D.P., Lapthorn A., Edwards R., Plant glutathione transferases, 2002. *Genome Biology* 3:1–10
- Dodd I.C., Hormonal interactions and stomatal responses, 2003. *Journal of Plant Growth Regulation* 22:32–46
- Dogimont C., Bendahmane A., Chovelon V., Boissot N., Host plant resistance to aphids in cultivated crops: Genetic and molecular bases, and interactions with aphid populations, 2010. *Comptes Rendus Biologies* 333:566–573
- Dong X., The role of membrane-bound ankyrin-repeat protein ACD6 in programmed cell death and plant defense, 2004. *Science's STKE* 22:6
- Dos Santos C.V., Rey P., Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response, 2006. *Plant Science* 11: 329-334
- Douce R., Bourguignon J., Neuburger M., Rebeille F., The glycine decarboxylase system: a fascinating complex, 2001. *Plant Science* 6:167-176
- Douglas A.E., Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions, 2006. *Journal of Experimental Botany* 57:747–754
- Dunn J.P., Frommelt K., Effects of below-ground herbivory by *Diabrotica virgifera virgifera* (Col, Chrysomelidea) and soil moisture on leaf gas exchange of maize, 1998. *Journal of Applied Entomology* 122:179–183
- Eckardt N. Probing the mysteries of lignin biosynthesis:the crystal structure of caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase provides new insights, 2002. *The Plant Cell* 14:1185–1189

- Ellis C., Karafyllidis I., Turner J.G., Constitutive activation of jasmonate signaling in an *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*, 2002. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 15:1025–1030
- Erb M., Flors V., Karlen D., De Lange E., Planchamp C., D'Alessandro M., Turlings T., Ton J., Signal signature of aboveground induced resistance upon belowground herbivory in maize, 2009. *Plant Journal* 59:292–302
- Erb M., Kollner T.G., Degenhardt J., Zwahlen C., Hibbard B.E., Turlings T.C.J., The role of abscisic acid and water stress in root herbivore-induced leaf resistance, 2011. *New Phytologist* 189:308–320
- Erb M., Ton J., Degenhardt J., Turlings T.C.J., Interactions between arthropod-induced aboveground and belowground defenses in plants, 2008. *Plant Physiology* 146:867–874
- Esquerre-Tugaye M.T., Boudart G., Dumas B., Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens, 2000. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:157–163
- Fidantsef A.L., Stout M.J., Thaler J.S., Duffey S.S., Signal interaction in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*, 1999. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54:97–114
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Cross talk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the point of convergence in the stress signalling network, 2006. *Current Opinion in Plant Biology* 9:436–442
- Furch A.C.U., Hafke J.B., Schulz A., van Bel A.J.E.,  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated remote control of reversible sieve tube occlusion in *Vicia faba*, 2007. *Journal of Experimental Botany* 58:2827–2838
- Galis I., Smith J.L., Jameson P.E., Salicylic acid-, but not cytokinin-induced, resistance to WC1MV is associated with increased expression of SA-dependent resistance genes in *Phaseolus vulgaris*, 2004. *Journal Plant and Physiology* 161:459–466
- Gange A.C., Brown V.K., Effects of root herbivory by an insect on a foliar-feeding species, mediated through changes in the host plant, 1989. *Oecologia*, 81:38–42
- Gange A.C., Species-specific responses of a root- and shoot-feeding insect to arbuscular mycorrhizal colonization of its host plant, 2001. *New Phytologist* 150:611–618
- Gatehouse J.A., Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction, 2002. *New Phytologist* 156:145–169
- Giordanengo P., Brunissen L., Rusterucci C., Vincent C., van Bel A., Dinant S., Gironse C., Faucher M., Bonnemain J.L., Compatible plant-aphid interactions: How aphids manipulate plant responses, 2010. *Comptes Rendus Biologies* 333 :516–523
- Giri A.P., Wunsche H., Mitra S., Zavala J.A., Muck A., Svatos A., Baldwin I.T., Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VII. Changes in the plant's proteome, 2006. *Plant Physiology* 142:1621–1641
- Gironse C., Moulia B., Silk W., Bonnemain J.L., Aphid infestation causes different changes in carbon and nitrogen allocation in alfalfa stems as well as different

- inhibitions of longitudinal and radial expansion, 2005. *Plant Physiology* 137:1474–1484
- Goggin F.L. Plant-aphid interactions: molecular and ecological perspectives, 2007. *Current Opinion in Plant Biology* 10:399–408
- Goggin F.L., Jia L.L., Shah G., Hebert S., Williamson V.M., Ullman D.E., Heterologous expression of the Mi-1.2 gene from tomato confers resistance against nematodes but not aphids in eggplant, 2006. *Molecular Plant Microbe Interaction* 19:383–388
- Goggin F.L., Williamson V.M., Ullman D.E., Variability in the response of *Macrosiphum euphorbiae* and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) to the tomato resistance gene Mi, 2001. *Environmental Entomology* 30:101–106
- Gordon K.H.J., Waterhouse P.M., RNAi for insect-proof plants, 2007. *Nature Biotechnology* 25:1231–1232
- Grant M., Lamb C., Systemic immunity, 2006. *Current Opinion in Plant Biology* 9:414–420
- Gutsche A., Heng-Moss T., Sarath G., Twigg P., Xia Y., Lu G., Mornhinweg D., Gene expression profiling of tolerant barley in response to *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae) feeding, 2009. *Bulletin of Entomological Research* 99:163–173
- Gutterson N., Reuber T.L., Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors, 2004. *Current Opinion in Plant Biology* 7:465–471
- Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R., Correlation between protein and mRNA abundance in yeast, 1999. *Molecular & Cellular Biology* 19:1720–1730
- Habibi J., Backus E.A., Coudron T.A., Brandt S.L., Effect of different host substrates on hemipteran salivary protein profiles, 2001. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98:369–375
- Hack C.J., Integrated transcriptome and proteome data: the challenges ahead, 2004. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 3:212–219
- Hahlbrock K., Bednarek P., Ciolkowski I., Hamberger B., Heise A., et al., Non-self-recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions, 2003. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100: 14569–14576
- Halitschke R., Schittko U., Pohnert G., Boland W., Baldwin I.T., Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore specific plant responses, 2001. *Plant Physiology* 125:711–17
- Harborne J.B., Introduction to Ecological Biochemistry, 1998. Academic Press, London. 318
- Hebert S.L., Jia L., Goggin F.L., Quantitative differences in aphid virulence and foliar symptom development on tomato plants carrying the *Mi* resistance gene, 2007. *Environmental Entomology* 36: 458–467
- Hegedus D., Yu M., Baldwin D., Gruber M., Sharpe A., Parkin I., Whitwill S., Lydiate D., Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress, 2003. *Plant Molecular Biology* 53:383–397
- Heide H., Kalisz H.M., Follmann H., The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity, 2004. *Journal of Plant Physiology* 161:139–149



- Heidel A.J., Baldwin I.T., Microarray analysis of salicylic acid- and jasmonic acid-signalling in responses of *Nicotiana attenuata* to attack by insects from multiple feeding guilds, 2004. *Plant, Cell & Environment* 27:1362–1373
- Heil M., Ton J., Long-distance signalling in plant defence, 2008. *Trends in Plant Science* 13:264–272
- Howe G.A., Jasmonates as signals in the wound response, 2004. *Journal of Plant Growth Regulation* 23:223–237
- Huang H.E., Ger M.J., Chen C.Y., Pandey A.K., Yip M.K., Chou H.W., Feng T.Y., Disease resistance to bacterial pathogens affected by the amount of ferredoxin-I protein in plants, 2007. *Molecular Plant Pathology* 8:129–137
- Hwang C.F., Williamson V.M., Leucine-rich repeat-mediated intramolecular interactions in nematode recognition and cell death signaling by the tomato resistance protein Mi, 2003. *Plant Journal* 34:585–593
- Jackson M., Hormones from roots as signals for the shoots of stressed plants, 1997. *Trends Plant Sci.*, 2, 22–28
- Jansen J.J., Allwood J.W., Marsden-Edwards E., van der Putten W.H., Goodacre R., van Dam N.M., Metabolomic analysis of the interaction between plants and herbivores, 2009. *Metabolomics* 5:150–161
- Jiang Y., Yang B., Harris N.S., Deyholos M.K., Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots, 2007. *Journal of Experimental Botany* 58:3591–36007
- Johansson M., Karlsson M., Johanson U., Kjellbom P., The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance, 2000. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:324–342
- Johnson S.N., Hawes C., Karley A.J., Reappraising the role of plant nutrients as mediators of interactions between root- and foliar-feeding insects, 2009. *Functional Ecology* 23:699–706
- Kalde M., Barth M., Somssich I. E., Lippok B., Members of *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are a part of different plant defense signaling pathways, 2003. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:295–305
- Kaloshian I., Gene-for-gene disease resistance: bridging insect pest and pathogen defense, 2004. *Journal of Chemical Ecology* 30:2421–39
- Kaloshian I., Kinsey M.G., Williamson V.M., Ullman D.E., *Mi*-mediated resistance against the potato aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae) limits sieve element ingestion, 2000. *Environmental Entomology* 29:690–695
- Kaloshian I., Lange W.H., Williamson V.M., An aphid-resistance locus is tightly linked to the nematode-resistance gene, *Mi* tomato, 1995. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 92:622–625
- Kaloshian I., Walling L.L., Hemipterans as plant pathogens, 2005. *Annual Review of Phytopathology* 43:491–521
- Kaplan I., Halitschke R., Kessler A., Sardanelli S., Denno R.F., Constitutive and induced defenses to herbivory in above- and belowground plant tissues, 2008. *Ecology*, 89: 392–406
- Karban R., Baldwin I.T., *Induced Responses to Herbivory*, 1997. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA
- Kawano T., Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction, 2003. *Plant Cell Reports* 21:829–837
- Kempema L.A., Cui X., Holzer F.M., Walling L.L., *Arabidopsis* transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids, 2007. *Plant Physiology* 143:849–865

- Kende H., Ethylene Biosynthesis, 1993. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 44: 283-307
- Kerchev P.I., Fenton B., Foyer C.H., Hancock R.D., Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways, 2011. Plant, Cell and Environment
- Kessler A., Baldwin I.T., Defensive function of herbivore-induced plant volatile emission in nature, 2002. Science 291:2141-2144
- Keyse S.M., Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity, 1998. Seminars in Cell and Developmental Biology 9:143-152
- Kim K.S., Bellendir S., Hudson K.A., Hill C.B., Hartman G.L., Hudson H. D.L.M.E., Diers B.W., Fine mapping the soybean aphid resistance gene Rag1 in soybean, 2010. Theoretical and Applied Genetics 120:1063–1071
- Kim T., Ok S.H., Kim D., Suh S., Byun M.O., Shin J.S., Molecular characterization of a biotic and abiotic stress resistance-related gene RelA/SpoT homologue (PepRSH) from pepper, 2009. Plant Science 176:635–642
- Klingler J., Creasy R., Gao L.L., Nair R.M., Calix A.S., Jacob H.S., Edwards O.R., Singh K.B., Aphid resistance in *Medicago truncatula* involves antixenosis and phloem-specific, inducible antibiosis, and maps to a single locus flanked by NBS-LRR resistance gene analogs, 2005. Plant Physiology 137:1445–1455
- Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., et al., Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase, 2007. The Plant Cell 19:1065–80
- Kodama H., Nishiuchi T., Seo S., Ohashi Y., Iba K., Possible involvement of protein phosphorylation in the wound-responsive expression of *Arabidopsis* plastid omega-3 fatty acid desaturase gene, 2000. Plant Science 155:153-160
- Koiwa H., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Regulation of protease inhibitors and plant defense, 1997. Trends Plant Science. 2:379–84
- Kopke D., Schroder R., Fischer H.M., Gershenzon J., Hilker M., Schmidt A., Does egg deposition by herbivorous pine sawflies affect transcription of sesquiterpene synthases in pine?, 2008. Planta 228:427–438
- Kost C., Heil M., Increased availability of extrafloral nectar reduces herbivory in Lima bean plants (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae), 2005. Basic and Applied Ecology 6:237–248
- Krishna P., Brassinosteroid-Mediated Stress Responses, 2003. Journal of Plant Growth Regulation 22:289–297
- Kuhn E., Schaller A., DNA microarrays: methodology, data evaluation, and application in the analysis of plant defense signaling, 2004. Setlow JK (ed) Genetic engineering, principles and methods. Kluwer Academic, Plenum 49–84
- Kusnierczyk A., Winge P., Jørstad T.S., Troczynska J., Rossiter J.T., Magnar Bones A., Towards global understanding of plant defence against aphids – timing and dynamics of early *Arabidopsis* defence responses to cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) attack, 2008. Plant, Cell and Environment 31:1097–1115
- Kusnierczyk A., Winge P., Midelfart H., Armbruster W.S., Rossiter J.T., Magnar Bones A., Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with different glucosinolate profiles after attack by polyphagous *Myzus persicae* and oligophagous *Brevicoryne brassicae*, 2007. Journal of Experimental Botany 58:2537-2552
- Lamport D.T.A., Kieliszewski M.J., Stress upregulates periplasmic arabinogalactan-proteins, 2005. Plant Biosystems 139:60–64

- Langenkamper G., Manac'h N., Broin M., Ciunè S., Becuwe N., Kuntz M., Pascal R., Accumulation of plastid lipid-associated proteins (fibrillin/CDSP34) upon oxidative stress, ageing and biotic stress in Solanaceae and in response to drought in other species, 2001. *Journal of Experimental Botany* 52:1545–54
- Lecourieux D., Ranjeva R., Pugin A., Calcium in plant defense-signaling pathways, 2006. *New Phytologist* 171:249–69
- Leitner-Dagan Y., Ovadis M., Shklarman E., Elad Y., Rav D.D., Vainstein A., Expression and functional analyses of the plastid lipid-associated protein CHRC suggest its role in chromoplastogenesis and stress, 2006. *Plant Physiology* 142:233–44
- Li J., Brader G., Palva E.T., The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate mediated and salicylate-mediated signals in plant defense, 2004. *The Plant Cell* 16:319–331
- Li J., Hee Nam K., Regulation of Brassinosteroid Signaling by a GSK3/SHAGGY-Like Kinase, 2002. *Science* 295:1299–1301
- Li Q., Xie Q., Smith-Becker J., Navarre D.A., Kaloshian I., *Mi-1*-Mediated Aphid Resistance Involves Salicylic Acid and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Cascades, 2006. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:655–664
- Li X.C., Schuler M.A., Berenbaum M.R., Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome p450 genes, 2002. *Nature* 419:712–715
- Li Y., Zou J., Li M., Bilgin D.D., Vodkin L.O., Hartman G.L., Clough S.J., Soybean defense responses to the soybean aphid, 2008. *New Phytologist* 179:185–195
- Lippert D., Chowrira S., Ralph S.G., Zhuang J., Aeschliman D., Ritland C., Ritland K., Bohlmann J., Conifer defense against insects: proteome analysis of sitka spruce (*Picea sitchensis*) bark induced by mechanical wounding or feeding by white pine weevils (*Pissodes strobi*), 2007. *Proteomics* 7:248–270
- Livak K.J., Schmittgen T.D., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method, 2001. *Methods* 25:402–408
- Lorenzo O., Piqueras R., Sanchez-Serrano J.J., Solano R., ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense, 2003. *The Plant Cell* 15:165–178
- Lu H., Rate D.N., Song J.T., Greenberg J.T., ACD6, a novel ankyrin protein, is a regulator and an effector of salicylic acid signaling in the Arabidopsis defense response, 2003. *The Plant Cell* 15:2408–2420
- Maffei M.E., Mithöfer A., Boland W., Before gene expression: early events in plant-insect interaction, 2007. *Trends Plant Science* 12:310–16
- Maleck K., Levine A., Eulgem T., Morgan A., Schmid J., Lawton K.A., Dangl J.L., Dietrich R.A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance, 2000. *Nature Genetics* 26:403–410
- Mano J., Early events in environmental stresses in plants — Induction mechanisms of oxidative stress, 2002. In *Oxidative Stress in Plants*. Edited by Inzé D. and Van Montagu M., Taylor & Francis, London 217–245
- Mantelin S., Bhattarai K.K., Kaloshian I., Ethylene contributes to potato aphid susceptibility in a compatible tomato host, 2009. *New Phytologist* 183: 444–456
- Mao P., Duan W., Wei C., Li Y., WRKY62 transcriptional factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression, 2007. *Plant Cell Physiology* 48:833–842
- Margaritopoulos J.T., Tsourapas C., Tzortzi M., Kanavaki O.M., Tsitsipis J.A. Host selection by winged colonisers within the *Myzus persicae* group: a contribution

- towards understanding host specialization, 2005. *Ecological Entomology* 30:406–418
- Martinez de Ilarduya O., Moore A.E., Kaloshian I., The tomato Rme1 locus is required for Mi-1-mediated resistance to root-knot nematodes and the potato aphid, 2001. *Plant Journal* 27:417–25
- Martinez de Ilarduya O., Nombela G., Hwang C-F., Williamson V.M., Muñiz M., Kaloshian I., Rme1 is necessary for Mi-1-mediated resistance and acts early in the resistance pathway, 2003. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:55-61
- Martinez de Ilarduya O., Xie Q-G., Kaloshian I., Aphid-induced defense responses in Mi-1-mediated compatible and incompatible tomato interactions, 2003. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 16:699–708
- Masters G.J., Brown V.K., Gange A.C., Plant mediated interactions between aboveground and belowground insect herbivores, 1993. *Oikos* 66:148–151
- Masters G.J., Brown V.K., Host-plant mediated interactions between spatially separated herbivores: effects on community structure. *Multitrophic Interactions in a Changing World*, 1992. 36th Symposium of the British Ecological Society (eds A.C. Gange & V.K. Brown), pp. 217–232 Blackwell Science Ltd, Oxford
- Masters G.J., Brown V.K., Plant-mediated interactions between two spatially separated insects, 1992. *Functional Ecology* 6:175–179
- Masters G.J., Jones T.H., Rogers M., Host-plant mediated effects of root herbivory on insect seed predators and their parasitoids, 2001. *Oecologia* 127:246–250
- Masters G.J., The impact of root herbivory on aphid performance: field and laboratory evidence, 1995. *Acta Oecologica*, 16:135–142
- Mattiacci L., Dicke M., Posthumus M.A., beta-Glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps, 1995. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:2036–40
- Mauch-Mani B., Mauch F., The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions, 2005. *Current Opinion in Plant Biology* 8:409–414
- McKinley R.G., Spaull A.M., Straub R.W., Pests of Solanaceous crops, 1992, McKinley RG, ed. *Vegetable crop pests*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press 263–326
- Meyers B.C., Kozik A., Griego A., Kuang H.H., Michelmore R.W. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*, 2003. *The Plant Cell* 15: 809–834
- Mewis I., Appel H.M., Hom A., Raina R., Schultz J.C. Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects, 2005. *Plant Physiology* 138:1149–1162
- Mewis I., Tokuhisa J.G., Schultz J.C., Appel H.M., Ulrichs C., Gershenzon J., Gene expression and glucosinolate accumulation in *Arabidopsis thaliana* in response to generalist and specialist herbivores of different feeding guilds and the role of defense signaling pathways, 2006. *Phytochemistry* 67:2450–2462
- Miles P.W., Aphid saliva, 1999. *Biological Reviews* 74:41–85
- Miles P.W., Oertli J.J., The significance of antioxidants in the aphid plant interaction: the redox hypothesis, 1993. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 67:275–283
- Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M.A., Shulaev V., Dangl J.L., Mittler R., The Plant NADPH Oxidase RBOHD Mediates Rapid Systemic Signaling in Response to Diverse Stimuli, 2009. *Plant Biology* 2:84
- Milligan S.B., Bodeau J., Yaghoobi J., Kaloshian I., Zabel P., Williamson V.M., The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine

- zipper, nucleotide binding, leucine rich repeat family of plant genes, 1998. *The Plant Cell* 10:1307-1319
- Mitsuda N., Iwase A., Yamamoto H., Yoshida M., Seki M., Shinozaki K., Ohme-Takagi M., NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*, 2007. *The Plant Cell* 19:270–280
- Mittler R., Vanderauwerab S., Gollerya M., Van Breusegem F., Reactive oxygen gene network of plants, 2004. *Trends plant science* 9:490-498
- Moran P.J., Cheng Y.F., Cassell J.L., Thompson G.A., Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant–aphid interactions, 2002. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 51:182–203
- Moran P.J., Thompson G.A., Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways, 2001. *Plant Physiology* 125:1074–1085
- Moreno JI, Martin R, Castresana C., *Arabidopsis* SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress, 2005. *The Plant Journal* 41:451–463
- Mori I.C., Murata Y., Yang Y., Munemasa S., Wang Y.F., et al., CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channels and stomatal closure, 2006. *PLoS Biology*. 4:327
- Morreel K., Ralph J., Lu F., Goeminne G., Busson R., Herdewijn P., Goeman J.L., Van der Eycken J., Boerjan W., Messens E., Phenolic profiling of caffeic acid O-methyltransferase-deficient poplar reveals novel benzodioxane oligolignols, 2004. *Plant Physiology* 136:4023–4036
- Mou Z., Fan W., Dong X., Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes, 2003. *Cell* 113:935–944
- Mozoruk J., Hunnicutt L.E., Cave R.D., Hunter W.B., Bausher M.G., Profiling transcriptional changes in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck challenged by herbivory from the xylem-feeding leafhopper, *Homalodisca coagulata* (Say) by cDNA macroarray analysis, 2006. *Plant Science* 170:1068–1080
- Murdock L.L., Shade R.E., Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects, 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:6605–6611
- Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H., Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling, 2005. *TRENDS in Plant Science* 10:339-346
- Nakashita H., Yasuda M., Nitta T., Asami T., Fujioka S., Arai Y., Sekimata K., Takatsuto S., Yamaguchi I., Yoshida S., Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice, 2003. *Plant Journal* 33:887–898
- Narvaez-Vasquez J., Florin-Christensen J., Ryan C.A., Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves, 1999. *The Plant Cell* 11:2249-2260
- Navarro L., Dunoyer P., Jay F., Arnold B., Dharmasiri N., Estelle M., Voinnet O., Jones J.D.G., A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling, 2006. *Science* 312:436–439
- Neill S., Desikan R., Hancock J., Hydrogen peroxide signaling, 2002. *Current Opinion in Plant Biology* 5:388–395
- Ng J.C.K., Perry K.L., Transmission of plant viruses by aphid vectors, 2004. *Molecular Plant Pathology* 5: 505–511
- Ni X., Quisenberry S.S., Heng-Moss T., Markwell J., Sarath G., Klucas R., Baxendale F., Oxidative responses of resistant and susceptible cereal leaves to symptomatic and non-symptomatic cereal aphid (Hemiptera: Aphididae) feeding, 2001. *Journal of Economic Entomology* 94:743–751

- Rouhier N., Lemaire S.D., Jacquot J.P., The Role of Glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutaredoxins and Glutathionylation, 2008. Annual Review of Plant Biology 59:143-166
- Nombela G., Beitia F., Muniz M., A differential interaction study of *Bemisia tabaci* Q-biotype on commercial tomato varieties with or without the Mi resistance gene, and comparative host responses with the B-biotype, 2001. Entomologia Experimentalis et Applicata 98, 339–344
- Ogawa K., Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses, 2005. Antioxidants & Redox Signaling 7:973–981
- Olivares-Hernández R., Bordel S., Nielsen J., Codon usage variability determines the correlation between proteome and transcriptome fold changes, 2011. BMC Systems Biology 25:33
- Orozco-Cardenas M.L., Narvaez-Vasquez J., Ryan C.A., Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate, 2001. The Plant Cell 13:179–91
- Park J.H., Halitschke R., Kim H.B., Baldwin I.T., Feldmann K.A., Feyereisen R., A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis, 2002. Plant Journal 31:1–12
- Park S.J., Huang Y., Ayoubi P., Identification of expression profiles of sorghum genes in response to greenbug phloem-feeding using cDNA subtraction and microarray analysis, 2006. Planta 223:932–947
- Parker W.E., Howard J.J., The biology and management of wireworms (*Agriotes* spp.) on potato with particular reference to the U.K., 2001. Agricultural and Forest Entomology 3:85-98
- Paschold A., Halitschke R., Baldwin I.T., Co(i)-ordinating defenses: NaCOI1 mediates herbivore-induced resistance in *Nicotiana attenuata* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses, 2007. The Plant Journal 51:79–91
- Pauquet J., Burget E., Hagen L., Chovelon V., Valot L.M. A.N., et al., Map based cloning of the Vat gene from melon conferring resistance to both aphid colonization and aphid transmission of several viruses, 2004. A. Lebeda, H. Paris (Eds.), Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA meeting on Cucurbit genetics and breeding, Palacky University, Olomouc, Czech Republic, 325–329
- Pautot V., Holzer F.M., Reisch B., Walling, L.L., Leucine aminopeptidase: An inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato), 1993. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 90:9906-9910
- Pegadaraju V., Knepper C., Reese J., Shah J., Premature leaf senescence modulated by the Arabidopsis PHYTOALEXIN DEFICIENT4 gene is associated with defense against the phloem-feeding green peach aphid, 2005. Plant Physiology 139:1927–1934
- Pegadaraju V., Luis J., Singh V., Reese J.C., Bautor J., et al., Phloem-based resistance to green peach aphid is controlled by Arabidopsis PHYTOALEXIN DEFICIENT4 without its signaling partner ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1, 2007. The Plant Journal 52:332–341
- Pieterse C.M.J., Ton J., Van Loon L.C., Cross-talk between plant defence signaling pathways: boost or burden?, 2001. AgBiotechNet 3:1-8
- Poveda K., Steffan-Dewenter I., Scheu S., Tschardt T., Effects of below- and above-ground herbivores on plant growth, flower visitation and seed set, 2003. Oecologia 135:601-605

- Poveda K., Steffan-Dewenter I., Scheu S., Tscharnkte T., Effects of decomposers and herbivores on plant performance and aboveground plant insect interactions, 2005. *Oikos* 108:503–510
- Powell G., Tosh C.R., Hardie J., Host plant selection by aphids: Behavioral, evolutionary, and applied perspectives, 2006. *Annual Review of Entomology* 51:309–330
- Pozo M.J., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J., Jasmonates-signals in plant microbe interactions, 2004. *Journal of Plant Growth Regulation* 23:211–222
- Prost I., Dhondt S., Rothe G., Vicente J., José Rodríguez M., Kift N., et al., Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins Supports Their Involvement in Defense against Pathogens, 2005. *Plant Physiology* 139:1902–1913
- Qian W.J., Liu T., Monroe M.E., Strittmatter E.F., Jacobs J.M., Kangas L.J., et al. Probability-based evaluation of peptide and protein identifications from tandem mass spectrometry and SEQUEST analysis: the human proteome, 2005. *Journal of Proteome Research* 4:53–62
- Qiu B.L., Harvey J.A., Raaijmakers C.E., Vet L.E.M, van Dam N.M., Nonlinear effects of plant root and shoot jasmonic acid application on the performance of *Pieris brassicae* and its parasitoid *Cotesia glomerata*, 2009. *Functional Ecology* 23:496–505
- Qubbaj T., Reineke A., Zebitz C.P.W., Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its primary host *Malus domestica*, 2005. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115:145–152
- Rahbe Y., Deraison C., Bonade-Bottino M., Girard C., Nardon C., Jouanin L., Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduced performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape, 2003. *Plant Science* 164:441–450
- Rakwal R., Agrawal G.K., Jwa N.S., Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors, 2001. *Gene* 263:189–198
- Rasmann S., Kollner T.G., Degenhardt J., Hiltpold I., Toepfer S., et al., Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots, 2005. *Nature* 434:732–737
- Rasmann, S., Turlings T.C.J.. Simultaneous feeding by aboveground and belowground herbivores attenuates plant-mediated attraction of their respective natural enemies, 2007. *Ecology Letters* 10:926–936
- Reymond P., Bodenhausen N., Van Poecke R.M., Krishnamurthy V., Dicke M., Farmer E.E., A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore, 2004. *The Plant Cell* 16:3132–3147
- Reymond P., Weber H., Damond M., Farmer E.E., Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*, 2000. *The Plant Cell* 12:707–719
- Ribeiro A.P.O., Pereira E.J.G., Galvan T.L., Picanco M.C., Picoli E.A.T., et al., Effect of eggplant transformed with oryzacystatin gene on *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*, 2006. *Journal of Applied Entomology* 130:84–90
- Robatzek S., Somssich I.E., Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense, 2002. *Genes & Development* 16:1139–1149
- Rocco M., D'Ambrosio C. Arena S., Faurobert M., Scaloni A., Marra M., Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening, 2006. *Proteomics* 6:3781–91

- Rodriguez-Saona C.R., Musser R.O., Vogel H., Hum-Musser S.M., Thaler J.S., Molecular, Biochemical, and Organismal Analyses of Tomato Plants Simultaneously Attacked by Herbivores from Two Feeding Guilds, 2010. *Journal of Chemical Ecology* 36:1043–1057
- Rojo E., Solano R., Sanchez-Serrano J.J., Interactions between signalling compounds involved in plant defence, 2003. *Journal of Plant Growth Regulation* 22:82–98
- Rojo E., Titarenko E., Leon J., Berger S., Vancanneyt G., Sanchez-Serrano J.J., Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and – independent wound signal transduction pathway in *Arabidopsis thaliana*, 1998. *Plant Journal* 13:153-165
- Romeis T., Ludwig A.A., Martin R., Jones J.D., Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defense response, 2001. *Embo Journal* 20:5556–67
- Rossi M., Goggin F.L., Milligan S.B., Kaloshian I., Ullman D.E., Williamson V.M., The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid, 1998. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95:9750-9754
- Ryan C.A., The systemin signalling pathway: differential activation of plant defensive genes, 2000. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure et Molecular Enzymologia* 1477:112-121
- Sagi M., Davydov O., Orazova S., Yesbergenova Z., Ophir R., et al., Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*, 2004. *The Plant Cell* 16:616–28
- Saha D., Prasad A.M., Srinivasan R., Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants, 2007. *Plant Physiology and Biochemistry* 45:521-534
- Samac D.A., Hironaka C.M., Yallaly P.E., Shah D.M. Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana*, 1990. *Plant Physiology* 93:907–914
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T, *Molecular cloning: A laboratory manual* 2nd edition, 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sánchez-Pons N., Irar S., García-Muniz N., Vicient C.M., Transcriptomic and proteomic profiling of maize embryos exposed to camptothecin, 2011. *Plant Biology* 11:91
- Sandstrom J., Telang A., Moran N.A., Nutritional enhancement of host plants by aphids: a comparison of three aphid species on grasses, 2000. *Journal of Insect Physiology* 46:33–40
- Schenk P.M., Kazan K., Manners J.M., Anderson J.P., Simpson R.S., Wilson I.W., Somerville S.C., Maclean D.J., Systemic gene expression in *Arabidopsis* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*, 2003. *Plant Physiology* 132:999–1010
- Schmelz E.A., LeClere S., Carroll M.J., Alborn H.T., Teal P.E., Cowpea chloroplastic ATP synthase is the source of multiple plant defense elicitors during insect herbivory, 2007. *Plant Physiology* 144:793–805
- Schoonhoven L.M., Van Loon J.J.A., Dicke M. *Insect-plant biology*, 2005. Oxford University Press, Oxford
- Schroder R., Cristescu S.M., Harren F.J.M., Hilker M., Reduction of ethylene emission from Scots pine elicited by insect egg secretion, 2007. *Journal of Experimental Botany* 58:1835–1842
- Schweighofer, A., Kazanaviciute, V., Scheikl, E., Teige, M., Doczi, R., et al., The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6,



- modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in *Arabidopsis*, 2007. *The Plant Cell* 19:2213–2224
- Shapiguzov A., Edvardsson A., Vener A.V., Profound redox sensitivity of peptidyl-prolyl isomerase activity in *Arabidopsis* thylakoid lumen, 2006. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 580:3671–3676
- Simmons A.T., Gurr G.M., McGrath D., Nicol H.I., Martin P.M., Trichomes of *Lycopersicon* spp. and their effect on *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), 2003. *Australian Journal of Entomology* 42:373–378
- Singh K.B., Foley R.C., Oñate-Sánchez L., Transcription factors in plant defense and stress responses, 2002. *Current Opinion in Plant Biology* 5:430–436
- Skibbe M., Qu N., Galis I., Baldwin I.T., Induced Plant Defenses in the Natural Environment: *Nicotiana attenuata* WRKY3 and WRKY6 Coordinate Responses to Herbivory, 2008. *The Plant Cell* 20: 1984–2000
- Smith C.M., Boyko E.V., The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status, 2006. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 122:1-16
- Smith C.M., Liu X., Wang L.J., Liu X., Chen M., Starkey S., Bai J., Aphid Feeding Activates Expression of a Transcriptome of Oxylin-based Defense Signals in Wheat Involved in Resistance to Herbivory, 2010. *Journal of Chemical Ecology* 36:260–276
- Soler R., Bezemer T.M., Cortesero A.M., Van der Putten W.H., Vet L.E.M., Harvey J.A., Impact of foliar herbivory on the development of a root-feeding insect and its parasitoid, 2007. *Oecologia* 152:257–264
- Soler R., Bezemer T.M., Van Der Putten W.H., Vet L.E.M., Harvey J.A., Root herbivore effects on above-ground herbivore, parasitoid and hyperparasitoid performance via changes in plant quality, 2005. *Journal of Animal Ecology* 74:1121–1130
- Soler R., Harvey J.A., Kamp A.F.D., Vet L.E.M., Van Der Putten W.H., et al. Root herbivores influence the behavior of an aboveground parasitoid through changes in plant-volatile signals, 2007. *Oikos* 116:367–76
- Souter M., Topping J., Pullen M., Friml J., Palme K., Hackett R., Grierson D., Lindsey K., Hydra mutants of *Arabidopsis* are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling, 2002. *The Plant Cell* 14:1017-1031
- Staswick P.E., Tiryaki I., The oxylin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*, 2004. *The Plant Cell* 16:2117–2127
- Sunkar R., Bartels D., Kirch H.H., Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance, 2003. 35:452–464
- Sylwia G., Bogumil L., Wieslaw O., Effect of low and high-saponin lines of alfalfa on pea aphid, 2006. *Journal of Insect Physiology* 52:737-743
- Takatsui H., Zinc-finger transcription factors in plants, 1998. *Cellular and Molecular Life Science* 54:582–596
- Tamayo M.C., Rufat M., Bravo J.M., San Segundo B., Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae, 2000. *Planta* 211:62–71
- Tateda C., Yamashita K., Takahashi F., Kusano T., Takahashi Y., Plant voltage-dependent anion channels are involved in host defense against *Pseudomonas cichorii* and in Bax-induced cell death, 2009. *Plant Cell Reports* 28:41–51

- Taylor J.E., Hatcher P.E., Paul N.D, Crosstalk between plant responses to pathogens and herbivores: a view from the outside, 2004. *Journal of Experimental Botany* 55:159–168
- Thaler J.S., Bostock R.M., Interactions between abscisic acid mediated responses and plant resistance to pathogens and insects, 2004. *Ecology* 85:48–58
- Thaler J.S., Stout M.J., Karban R., Duffey S.S., Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores, 2001. *Ecology Entomology* 26: 312–324
- Thomas S., Mistral P., Chareyron V., Boissot N., Marker assisted selection of genes and QTLs for resistance combinations to *Aphis gossypii* in melon, 2008. M. Pitrat (Ed.), 9th EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae, Avignon, France 471–475
- Thompson G.A., Goggin F.L., Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects, 2006. *Journal of Experimental Botany* 57: 755–766
- Tirajoh A., Aung T.S.T., McKay A.B., Plant A.L., Stress-responsive a-dioxygenase expression in tomato roots, 2005. *Journal of Experimental Botany* 56:713–723
- Tjallingii W.F., Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses, 2006. *Journal of Experimental Botany* 57:739–745
- Torres M.A., Dangl J.L., Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development, 2005. *Current Opinion in Plant Biology* 8:397–403
- Tremblay E., *Entomologia applicata, generalità e mezzi di controllo*, 2003. Liguori Editore
- Turlings T.C.J., Benrey B., Effects of plant metabolites on the behavior and development of parasitic wasps, 1998. *Eco-Science* 5:321–33
- Turlings T.C.J., McCall P.J., Alborn H.T., Tumlinson J.H., An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps, 1993. *Journal of Chemical Ecology* 19:411–425
- van Dam N. M., Horn M., Mares M., Baldwin I. T., Ontogeny constrains the systemic proteinase inhibitor response in *Nicotiana attenuate*, 2001. *Journal of Chemical Ecology* 27:547–568
- van Dam N.M., Harvey J.A., Wackers F.L., Bezemer T.M., van der Putten W.H., Vet, L.E.M. Interactions between aboveground and belowground induced responses against phytophages, 2003. *Basic Applied of Ecology*, 4:63–77
- van Dam N.M., Raaijmakers C.E., van der Putten W.H., Root herbivory reduces growth and survival of the shoot feeding specialist *Pieris rapae* on *Brassica nigra*, 2005. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115:161–170
- Van der Biezen E., Jones J.D.G., Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept, 1998. *Trends in Biochemical Sciences* 23:454–456
- Van der Putten W.H., Vet L.E.M., Harvey J.A., Wackers F.L., Linking above- and below-ground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists, 2001. *Trends in Ecology & Evolution* 16:547–554
- Van Loon L.C., Geraats B.P.J., Linthorst H.J.M. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants, 2006. *Trends Plant Science* 11:184–191
- Van Poecke R.M.P., Dicke M., Indirect defence of plants against herbivores: using *Arabidopsis thaliana* as a model plant, 2004. *Plant Biology* 6:387–401
- Vignols F., Jose-Estanyol M., Caparros-Ruiz D., Rigau J., Puigdomenech P., Involvement of a maize proline-rich protein in secondary cell wall formation as

- deduced from its specific mRNA localization, 1999. *Plant Molecular Biology* 39:945–952
- Villada E.S., Gonzalez E.G., Lopez-Sese A.I., Castiel A.F., Gomez-Guillamon M.L., Hypersensitive response to *Aphis gossypii* Glover in melon genotypes carrying the Vat gene, 2009. *Journal of Experimental Botany* 60:3269–3277
- Voelckel C., Weisser W.W., Baldwin I.T., An analysis of plant–aphid interactions by different microarray hybridization strategies, 2004. *Molecular Ecology* 13:3187–3195
- Vogel H., Kroymann J., Mitchell-Olds T., Different transcript patterns in response to specialist and generalist herbivores in the wild *Arabidopsis* relative *Boechera divaricarpa*, 2007. *PLoS ONE* 2:1081
- Von Dahl C.C., Baldwin I.T., Deciphering the role of ethylene in plant herbivore interactions, 2007. *Journal of Plant Growth Regulation* 26:201–209
- Vorwerk S., Somerville S., Somerville C., The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance, 2004. *Trends Plant Science* 9:203–209
- Vriezen W.H., Hulzink R., Mariani C., Voesenek L., 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase activity limits Ethylene in *Rumex palustris* during submergence, 1999. *Plant Physiology* 121:189–195
- Wackers F.L., Bezemer T.M., Root herbivory induces an above-ground indirect defence, 2003. *Ecology Letters* 6:9–12
- Wackers F.L., Zuber D., Wunderlin R., Keller F., The effect of herbivory on temporal and spatial dynamics of foliar nectar production in cotton and castor, 2001. *Annals of Botany* 87:365–370
- Walgenbach J.F., Effect of potato aphid (Homoptera: Aphididae) on yield, quality, and economics of staked-tomato production, 1997. *Journal of Economic Entomology* 90:996–1004
- Walling L.L., Adaptive Defense Responses to Pathogens and Insects, 2009. *Advances in Botanical Research* 51:551–612
- Walling L.L., Avoiding effective defenses: Strategies employed by phloem feeding insects, 2008. *Plant Physiology* 146:859–866
- Walling L.L., The myriad plant responses to herbivores, 2000. *Journal of Plant Growth Regulation* 19:195–216
- Wang D., Amornsiripanitch N., Dong X., A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants, 2006. *PLoS Pathogens* 2:1042–1050
- Wasternack C., Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development, 2007. *Annals of Botany* 100:681–97
- Wei Z., Hu W., Lin Q., Cheng X., Tong M., Zhu L., Chen R., He G., Understanding rice plant resistance to the Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens*): A proteomic approach, 2009. *Proteomics* 9:2798–2808
- Weigel R.R., Bauscher C., Pfitzner A.J., Pfitzner U.M. NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from *Arabidopsis* that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants, 2001. *Plant Molecular Biology* 46:143–160
- Weigel R.R., Pfitzner U.M., Gatz C., Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in *Arabidopsis*, 2005. *The Plant Cell* 17:1279–1291
- Will T., Tjallingii W.F., Thonnessen A., Van Bel A.J. E., Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva, 2007. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104:10536–10541

- Will T., Van Bel A.J.E., Physical and chemical interactions between aphids and plants, 2006. *Journal of Experimental Botany* 57:729–737
- Winz R.A., Baldwin I.T., Molecular Interactions between the Specialist Herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and Its Natural Host *Nicotiana attenuata*. IV. Insect-Induced Ethylene Reduces Jasmonate-Induced Nicotine Accumulation by Regulating Putrescine N-Methyltransferase Transcripts. 2001, *Plant Physiology* 125:2189–2202
- Wormuth D., Heiber I., Shaikali J., Kandlbinder A., Baier M., Dietz K.J., Redox regulation and antioxidative defence in *Arabidopsis* leaves viewed from a systems biology perspective, 2007. *Journal of Biotechnology* 129:229–248
- Wu J., Baldwin I.T., New insights into plant responses to the attack from insect herbivores, 2010. *Annual Review of Genetics* 44:1–24
- Wu J., Hettenhausen C., Meldau S., Baldwin I.T., Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuate*, 2007. *The Plant Cell* 19:1096–1122
- Wu J., Luo X., Guo H., Xiao J., Tian Y., Transgenic cotton, expressing *Amaranthus caudatus* agglutinin, confers enhanced resistance to aphids, 2006. *Plant Breeding* 125:390–394
- Wu K.L., Guo Z.J., Wang H.H., Li J., The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins, 2005. *DNA Research* 12:9–26
- Wurst S., Van Der Putten W.H., Root herbivore identity matters in plant-mediated interactions between root and shoot herbivores, 2007. *Basic and Applied Ecology* 8:491–499
- Xu X.P., Chen C.H., Fan B.F., Chen Z.X. Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors, 2006. *The Plant Cell* 18:1310–1326
- Yan J., Zhang C., Gu M., Bai Z., Zhang W., et al., The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor, 2009. *The Plant Cell* 21:2220–36
- Yan S.P., Zhang Q.Y., Tang Z.C., Su W.A., Sun W.N., Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice, 2006. *Molecular & Cellular Proteomics* 5:484–496
- Yang E.J., Oh Y.A., Lee E.S., Park A.R., Cho S.K., Yoo Y.J., Parka O.K., Oxygen-evolving enhancer protein 2 is phosphorylated by glycine-rich protein 3/wall-associated kinase 1 in *Arabidopsis*, 2003. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305:862–868
- Yanhui C., Xiaoyuan Y., Kun H., Meihua L., Jigang L., Zhaofeng G., Zhiqiang L., Yunfei Z., et al., The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family, 2006. *Plant Molecular Biology* 60:107–124
- Yoshinaga N., Aboshi T., Ishikawa C., Fukui M., Shimoda M., et al., Fatty acid amides, previously identified in caterpillars, found in the cricket *Teleogryllus taiwanemma* and fruit fly *Drosophila melanogaster* larvae, 2007. *Journal of Chemical Ecology* 33:1376–81
- You M.K., Oh S.I., Ok S.H., Cho S.K., Shin H.Y., Jeung J.U., Shin J.S., Identification of putative MAPK kinases in *Oryza minuta* and *O. sativa* responsive to biotic stresses, 2007. *Molecules and Cells* 23:108–114
- Zarate S.I., Kempema L.A., Walling L.L., Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses, 2007. *Plant Physiology* 143:866–875

- Zhang W.Z., Chait B.T., ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information, 2000. *Analytical Chemistry* 72:2482–9
- Zhong R., Lee C., Zhou J., McCarthy R.L., Ye Z.H., A battery of transcription factors Involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis 2008. *The Plant Cell*, 20:2763–2782
- Zhu-Salzman K., Luthe D.S., Felton G.W., Arthropod-Inducible Proteins: Broad Spectrum Defenses against Multiple Herbivores, 2008. *Plant Physiology* 146:852–858
- Zhu-Salzman K., Salzman R.A., Ahn J-E., Koiwa H., Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid, 2004. *Plant Physiology* 134: 420-431
- Zhu-Salzman K., Shade R.E., Koiwa H., Salzman R.A., Narasimhan M., Bressan I.A., Hasegawa P.M., Murdock L.L., Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II, 1998. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 15123–15128
- Zwicker S., Mast S., Stos V., Pfitzner A.J.P., Pfitzner U.M., Tobacco NIMIN2 proteins control PR gene induction through transient repression early in systemic acquired resistance, 2007. *Molecular Plant Pathology* 8:385–400

## APPENDICE

Tabella A.1: Elenco dei geni differenzialmente espressi (p-value <0,05 e fold-change 2) nelle piante di pomodoro cv. Microtom a 24h dall'infestazione con l'afide *M. euphorbiae*.

Processo biologico	N° Accesione	Probe	Fold change	descrizione
<b>Organizzazione cellulare</b>				
	TA56653_4081	a_96_p126562	2,1183	Set Domain Protein, Putative
	AK321503	a_96_p051506	3,0005	Ku P80 DNA Helicase, Putative
	AK246698	a_96_p035476	4,6275	Maf Family Protein
		a_96_p104394	5,0726	
		a_96_p104399	4,4726	
	AK247647	a_96_p232724	-2,5567	S-Locus F-Box-Like Protein B
	BF096387	a_96_p180889	2,0075	AAA-Type Atpase Family Protein_ATRFC1
	AK321716	a_96_p219359	3,2184	Cellular Nucleic Acid Binding
		a_96_p006496	2,7901	
	BT013746	a_96_p101809	2,2049	Atp Binding/Myosin Heavy Chain-Like Protein
	BG133055	a_96_p189474	-2,142	Bop/Npr1/Nim1-Like Regulatory Protein
	DB702642	a_96_p063666	5,1252	HIPL1 Protein
	AK325735	a_96_p169304	2,1141	Homeobox Protein
<b>Trascrizione</b>				
	AJ319939	a_96_p141502	-7,6273	Floral Homeotic Protein DEFICIENS/MADS1_PETHY Transcription Factor
	DQ674532	a_96_p054306	-2,1220	Floral Homeotic Protein DEFICIENS/MADS1_PETHY Transcription Factor
	TA53678_4081	a_96_p114197	2,1616	MADS-Box Protein 1
	AK320075	a_96_p144516	-2,0653	Nucleic Acid Binding
	DB694047	a_96_p222094	2,5548	Nucleic Acid Binding
		a_96_p222094	2,1530	
	AK328735	a_96_p116847	-7,3671	Zinc Finger Protein-Related
	AK329598	a_96_p008956	2,0043	Bhlh Transcription Factor
	AI484597	a_96_p130242	-2,0692	NAC Domain
	AI484010	a_96_p056006	-2,3843	Bzip Transcription Factor
		a_96_p149081	-2,6837	
	AK325041	a_96_p22521	10,7098	WRKY Transcription Factor 40
	BM412776	a_96_p208414	3,4400	WRKY Transcription Factor 6
	AK322575	a_96_p044266	3,5022	WRKY Transcription Factor 6
		a_96_p091939	4,0812	
		a_96_p197639	4,2136	
		a_96_p247587	3,7206	
	AK326917	a_96_p140037	2,6926	WRKY Transcription Factor-30
	AK320209	a_96_p012306	2,2456	Ap2 Erf Domain-Containing Transcription Factor/ PTI5
	AK319328	a_96_p116717	2,3175	Atp-Dependent Rna And Dna Helicase
	EF439055	a_96_p128538	2,0260	Maturase K
		a_96_p249258	2,1543	
<b>Modificazione della parete cellulare</b>				
	ES895760	a_96_p250597	2,8942	Kinesin Motor Family Protein
	DB706064	a_96_p262762	-2,1039	Cellulose Synthase-Like Protein Cslg
	AK320411	a_96_p069056	2,4150	Cellulose Synthase-Like C5

AK247539	a_96_p010186	2,5505	Leucine-Rich Repeat Extensin-Like Protein 5
AK322747	a_96_p070414	-2,9937	Alpha-L-Fucosidase 2
BI208943	a_96_p009201	2,2404	Polygalacturonase, Putative
AK321593	a_96_p119287	2,7111	UPF0497 Membrane Protein
	a_96_p205044	2,6573	
<b>Stress e risposte di difesa</b>			
BT013102	a_96_p208239	-2,0836	Temperature-Induced Lipocalin
AK329932	a_96_p140267	-2,1329	Ankyrin Repeat-Containing
DY523815	a_96_p248207	-2,8769	1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase
AW217769	a_96_p008626	-2,1786	SAMT: Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase
BT013052	a_96_p011206	2,3734	Proline Rich Protein
AI776903	a_96_p032486	-2,5790	Proline-Rich Protein
BG130936	a_96_p191259	2,1126	Acidic Endochitinase
AK325364	a_96_p071174	-2,2401	MLO1 Protein
	a_96_p228429	-2,1300	
CN641308	a_96_p021136	5,0207	NIMIN2c Protein
EG553581	a_96_p020886	2,1186	Trypsin And Protease Inhibitor Family Protein
K03291	a_96_p195459	15,8994	Wound-Induced Proteinase Inhibitor 2
Z68309	a_96_p081144	-3,9541	Metallothionein-Like Protein
AI487335	a_96_p131452	-2,0015	Metallothionein-Like Protein
TC216940	a_96_p262722	-2,4903	Dehydrin-Like Protein
BT014452	a_96_p179204	2,0597	Dehydration-Responsive Family Protein
AK319585	a_96_p237472	-2,1426	Chaperone Protein Dnaj 20
BT013327	a_96_p073214	-2,0642	Heat Shock Protein
AI483204	a_96_p129572	2,0020	Heat Shock Protein 90
AK326805	a_96_p012956	-2,3337	Small Heat Shock Protein
TC192232	a_96_249487	-5,2279	E3 Ubiquitin-Protein Ligase XB3
AF272366	a_96_p012046	3,9486	Verticillium Wilt Disease Resistance Protein
<b>Trasduzione del segnale</b>			
AK326711	a_96_p031881	2,7120	ATP Binding Protein/ Serine/Threonine Protein Kinase
AK322221	a_96_p058996	-2,3909	Auxin-Induced Protein
BG627448	a_96_p065256	-2,0209	Calcium Binding Protein
AK247616	a_96_p109317	-2,0763	Calcium-Binding Ef Hand Family Protein
BF096921	a_96_p181414	-3,1197	Dog1 Alpha Splice Variant
AK326164	a_96_p131142	2,8730	Phi-1 Protein_ (Phosphate Induced Protein)
AK321945	a_96_p111782	-2,0648	Phosphatidic Acid Phosphatase-Related / PAP2-Related
AK325173	a_96_p062681	2,6542	Phosphoinositide Binding
BP885353	a_96_p212804	3,4325	Phototropin-2
TA37828_4081	a_96_p231289	-5,0961	Pas Lov Protein B Signal Transducer 2-Component Sensor
TC202529	a_96_p092314	-2,6203	Pas Lov Protein B Signal Transducer 2-Component Sensor
BE460487	a_96_p038726	-8,5721	Rela-Spot Like Protein RSH1
TA48642_4081	a_96_p160356	6,4929	Receptor-Like Protein Kinase, Putative
AW030223	a_96_p143756	4,0387	RIK1 (Receptor-Like Protein Kinase 1)
AK328772	a_96_p114392	-2,8348	Seven-Transmembrane-Domain Protein 1
AI894719	a_96_p139347	2,6484	Stress-Induced Receptor-Like Kinase
BG130117	a_96_p064386	2,1502	Swim Zinc Finger Family Protein
BG131915	a_96_p188784	-2,0702	Short-Chain Dehydrogenase Family Protein
AW623798	a_96_p159371	-2,0032	Short-Chain Dehydrogenase Reductase Family Protein

<b>Fotosíntesi</b>				
	AK321267	a_96_p009601	-3,3401	Blue Copper Protein
	AK326362	a_96_p234829	2,3669	Cytochrome B5
	TC216510	a_96_p119077	2,0075	Cytochrome B6 F Complex Subunit V
	AK325834	a_96_p097709	2,1305	Photosystem I Assembly Protein Ycf3
	SGN-U579906	a_96_p011281	-3,2468	Photosystem I Light Harvesting Complex Gene
<b>Metabolismo primario</b>				
	DB688137	a_96_p069589	-2,2588	Glucosyl Transferase
	AK321278	a_96_p141467	-2,1342	Nad-Dependent Epimerase Dehydratase
	TC212070	a_96_p036486	2,4364	Multicopper Oxidase
	DB683042	a_96_p074739	-2,0670	Phosphoenolpyruvate Carboxylase
	AK324959	a_96_p091704	3,1292	GDSL-Motif Lipase/Hydrolase Family Protein
	TC203649	a_96_p026291	3,3410	Lipid Binding Protein, Putative
	SGN-U571838	a_96_p080569	-2,1158	Phosphoethanolamine N-Methyltransferase
	AK320435	a_96_p080180	-2,0087	Phosphoethanolamine N-Methyltransferase
		a_96_p171254	-2,0368	
	TC206537	a_96_p081019	2,1662	Glycerophosphoryl Diester Phosphodiesterase Family Protein
	DB711461	a_96_p077834	2,1800	Glycerophosphoryl Diester Phosphodiesterase Family Protein
<b>Metabolismo proteico</b>				
	TC206669	a_96_p093909	2,0096	Calreticulin
	BW690832	a_96_p006906	2,0178	Calreticulin-3
	AW624594	a_96_p159941	-2,2243	Ormdl Family Protein
	AK326441	a_96_p112737	-2,2167	Serine Acetyltransferase
	BT013704	a_96_p204779	2,0397	Methionyl-Trna Synthetase
	AK319177	a_96_p021926	-5,3226	Protein Phosphatase Regulatory
	BT014333	a_96_p210809	-2,2969	Eukaryotic Translation Initiation Factor 6
<b>Metabolismo secundario</b>				
	BT014152	a_96_p169354	-2,0828	2-Methyl-6-Phytylbenzoquinone Methyltransferase
	DB703489	a_96_p085509	-2,1510	2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase
	BI933415	a_96_p206114	-2,9180	Alcohol Acyl Transferase
	GO376313	a_96_p046721	2,0555	Anthranilate N-Benzoyltransferase
	TA37793_4081	a_96_p092214	4,5432	Cer1 (Eceriferum 1) Octadecanal Decarbonylase
	BW685226	a_96_p080964	-2,6609	Cytochrome P450
	AK323685	a_96_p031206	-2,6553	Cytochrome P450
	AK326035	a_96_p184634	2,9397	Cytochrome P450
	AK322156	a_96_p032336	-3,5140	Cytochrome P450 Monooxygenase
	TC198063	a_96_p086429	-2,0933	Flavonoid 3-Hydroxylase, Putative/Cytochrome P450 92B1
	GO376166	a_96_p075074	-2,2270	Gibberellin 2-Oxidase
	AK328261	a_96_p068741	-6,7553	Gibberellin 2-Oxidase
	AK321597	a_96_p165776	2,4686	Hth Fad Binding Aldehyde-Lyase Mandelonitrile Lyase
	AK327749	a_96_p149286	-2,0400	Hyoscyamine 6-Dioxygenase, Putative
	AY840092	a_96_p054671	-2,3498	Monoterpene Synthase 2 (MTS2)
	AK323991	a_96_p121542	-2,8930	Myo-Inositol Oxygenase
	AK322827	a_96_p071759	-2,2083	Myo-Inositol Oxygenase
	DB692772	a_96_p230399	3,9563	Polyamine Oxidase
	BT012735	a_96_p005526	2,1791	Proline Dehydrogenase
	TC210141	a_96_p043831	2,03158	Protein Arginine N-Methyltransferase
	TC207273	a_96_p089734	-3,2015	Thiamin Biosynthetic Enzyme



AK319677	a_96_p071779	-2,7103	Thiamin Biosynthetic Enzyme
	a_96_p075039	-2,6157	
	a_96_p134237	-2,6553	
	a_96_p151151	-2,7539	
	a_96_p177709	-2,7665	
BP889283	a_96_p214434	-4,0050	Thiazole Biosynthetic Enzyme
BG627719	a_96_p192319	-13,2075	Tropinone Reductase li
AW038635	a_96_p148886	-2,2486	Undecaprenyl Pyrophosphate Synthetase
<b>Trasporto</b>			
BT013720	a_96_p243459	2,1064	Vacuolar Proton ATPASE A3
AI779304	a_96_p013656	-2,0037	Amino Acid Permease
BG134199	a_96_p190219	-2,0596	Aquaporin NIP1
BP899783	a_96_p218659	-2,6409	Monovalent Cation:Proton Antiporter, Putative
BP907108	a_96_p221019	-2,6087	Monovalent Cation:Proton Antiporter, Putative
AK324676	a_96_p123757	-2,6886	Sodium Transporter Hkt1-Like Protein
BM412833	a_96_p183314	4,8618	Pht4 2 (Phosphate Transporter 4 2)
TC211833	a_96_p113952	2,0852	Pht4 2 (Phosphate Transporter 4 2)
AK322276	a_96_p225984	-3,4276	Sulfate Transporter
TC216264	a_96_p121687	2,5514	Metal-Transporting P-Type Atpase
BP908484	a_96_p221724	-2,1125	Nitrate Transporter Ntl1
AW033168	a_96_p145496	-2,1848	Sodium-Dicarboxylate Cotransporter
BW692645	a_96_p057631	-2,0656	Sodium-Dicarboxylate Cotransporter
AW034814	a_96_p146486	2,7077	Carbohydrate Transporter/ Sugar Porter/ Transporter
<b>Funzione sconosciuta</b>			
AK224831	a_96_p148016	-2,0900	Hydrogen Peroxide-Induced 1
AK328929	a_96_p117882	3,4396	Hypothetical Protein
AK247362	a_96_p227439	2,5149	Hypothetical Protein
BF096967	a_96_p181464	2,0157	Hypothetical Protein
BI923160	a_96_p201069	-8,1062	Hypothetical Protein
AK328781	a_96_p175454	-2,7313	Hypothetical Protein
AK324668	a_96_p046151	-2,0177	Hypothetical Protein
AK320503	a_96_p119172	-2,2775	Lsh4 (Light Sensitive Hypocotyls 4)
DB689447	a_96_p229604	-2,2152	Predicted Protein
TC212869	a_96_p258802	2,8712	Protein
AK246976	a_96_p249632	2,4867	Protein
AK325939	a_96_p063571	2,2131	Protein
BI421412	a_96_p030636	2,2034	Protein
DV105139	a_96_p247147	2,1149	Protein
AK325762	a_96_p071514	2,0800	Protein
AK323609	a_96_p116932	2,0499	Protein
AK329241	a_96_p161666	-3,1340	Protein
AK321862	a_96_p066451	-2,2282	Protein
AW625905	a_96_p160586	-2,0567	Protein
BG631405	a_96_p194174	-2,1120	Putative Uncharacterized Protein
AI489857	a_96_p073369	-5,4151	Upa16

Tabella A.2: Elenco dei geni differenzialmente espressi (p-value <0,05 e fold-change 2) nelle piante di pomodoro cv. Microtom a 48h dall'infestazione con l'afide *M. euphorbiae*.

Processo biologico	N° Accesione	Probe	Fold change	descrizione
Organizzazione cellulare	AK319229	a_96_p157876	-2,4712	Aml5 Rna Binding Nucleic Acid Binding
	TC215597	a_96_p261557	-2,1459	Cyclic Phosphodiesterase, Putative
	GO372786	a_96_p011246	-2,5625	Endoribonuclease I-psp Family Protein
	BE461162	a_96_p178419	3,8553	Hat Family Dimerisation Domain Containing Protein
	BT013761	a_96_p018486	3,1168	Nucleolar Protein
	DB711179	a_96_p235305	2,1358	Nucleotidyltransferase, Putative
	AK327292	a_96_p251787	2,2272	Pin2-Interacting Protein X1, Putative
	AW221142	a_96_p153906	2,2093	Putative STH1 Protein
	AK322015	a_96_p229344	2,3696	Translation Transactivator/Inclusion Body Protein
	AK320615	a_96_p061416	2,4268	Brca1-Associated Protein (Zinc Finger Protein)(DNA Helicase)
	AK323822	a_96_p242264	2,0954	Endo/Excinuclease Amino Terminal Domain-Containing Protein
	AK329941	a_96_p052426	2,2458	Rex1 Dna Repair Family Protein
	AW160104	a_96_p151431	-2,0119	Snf2 Domain-Containing Protein
	AK320815	a_96_p087264	-2,0008	Uv Excision Repair Protein
		a_96_p135032	-2,3901	
	AK324308	a_96_p232594	3,4603	Protein Arginine Methyltransferase
	AK247327	a_96_p066011	2,5738	Endonuclease Exonuclease Phosphatase Family Protein
	AK324764	a_96_p179139	-2,2478	Histone H1
	AK322009	a_96_p010266	-3,3349	Histone H2a
	AW429173	a_96_p155691	-2,0908	Histone H4
	AK325599	a_96_p016806	2,5810	Nrp2 (Nap1-Related Protein 2)
	AK324372	a_96_p184374	2,2280	Nucleolar Protein
	DB715419	a_96_p086069	2,3382	Nucleosome Assembly Protein
	BT013575	a_96_p056026	2,4279	Nucleosome Assembly Protein
	BP878849	a_96_p210249	2,4497	Nucleosome Assembly Protein 1-Like Protein 1
	TA56620_4081	a_96_p126437	-2,7854	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
	AW945074	a_96_p169779	-3,0756	Ribonucleoside-Diphosphate Reductase Small Chain
	AK321413	a_96_p046276	-2,3941	Uracil Phosphoribosyltransferase
	AK320565	a_96_p227774	2,0866	Plant Synaptotagmin
	AK320225	a_96_p027701	2,2218	Cyclin D1-Dependent Protein Kinase Regulator
	AW623936	a_96_p027956	2,0332	Pym Protein
	BG129531	a_96_p187359	-2,1919	Cyclin D2 Protein
	AK247181	a_96_p079774	-2,0826	Formin-Like Protein 3
	AK319324	a_96_p061206	2,1497	Atmap65-6 Microtubule Binding
	AK322712	a_96_p230014	2,2266	DNA-Binding Protein RHL1
	AW035098	a_96_p072394	-2,0001	Formin-Like Protein 3
	AW220019	a_96_p025566	-3,6731	Formin-Like Protein 9
	U50195	a_96_p000161	-3,8444	Profilin
	AK325311	a_96_p093324	2,3073	Senescence-Associated Protein-Related
	AK326684	a_96_p068856	2,3781	Nodulin Family Protein
	TA40785_4081	a_96_p257842	6,2810	Cell Division Protein Aaa Atpase Family
	TA42168_4081	a_96_p255989	2,0945	Cop9 Signalosome Complex Subunit, Putative
	TA44514_4081	a_96_p180509	2,3068	Notchless Protein Homolog
	AY186735	a_96_p128692	-3,6333	Sp3d
	AK323048	a_96_p068071	-3,2167	Sp5g
	TC199421	a_96_p119372	-2,0026	Cytokinin Oxidase

AK329474	a_96_p163066	2,4965	Translationally Controlled Tumor Protein
	a_96_p215059	2,2312	
	a_96_p216149	2,2119	
	a_96_p161896	2,1752	
	a_96_p208794	2,1538	
	a_96_p166509	2,0804	
	a_96_p089059	2,0469	
AW649133	a_96_p161836	2,0894	Translationally Controlled Tumor Protein
TA36514_4081	a_96_p089089	2,0024	Translationally Controlled Tumor Protein
<b>Trascrizione</b>			
AK327654	a_96_p127157	2,4459	KH Domain-Containing RNA-Binding Protein (HEN4)
AK322141	a_96_p127967	2,0016	Pentatricopeptide Repeat-Containing
DB712446	a_96_p236098	2,3699	Pentatricopeptide Repeat-Containing
BI921157	a_96_p200134	2,3845	Pentatricopeptide Repeat-Containing
DB708048	a_96_p233754	2,5627	Pentatricopeptide Repeat-Containing
CD002745	a_96_p066731	3,6448	Pentatricopeptide Repeat-Containing
AK327563	a_96_p240733	2,0671	Pentatricopeptide Repeat-Containing Protein
BE449718	a_96_p175389	2,3417	Pentatricopeptide Repeat-Containing Protein
AI489068	a_96_p132197	3,0710	Pentatricopeptide Repeat-Containing Protein
AK325206	a_96_p124327	5,2013	Pentatricopeptide Repeat-Containing Protein
AW929009	a_96_p070229	6,1674	Pentatricopeptide Repeat-Containing Protein
AK247091	a_96_p229339	2,1565	Retrotransposon Protein
BE432850	a_96_p172810	2,4706	Rna Helicase
BE434978	a_96_p174124	-2,4229	RNA Recognition Motif-Containing Protein
AK323530	a_96_p005751	-2,0049	RNA-Binding Protein, Putative
AK321234	a_96_p164751	3,2674	Atgtf2h2/Gtf2h2 (General Transcription Factor Iih 2)
	a_96_p061626	3,1759	
TA56964_4081	a_96_p127817	3,8332	Bzip Transcription Factor Family Protein
AW032641	a_96_p145161	2,8131	Dna Binding Protein
AI488544	a_96_p131962	-2,4790	Dna-Binding Protein
AK321246	a_96_p228544	2,3338	Dof-Type Zinc Finger Domain-Containing Protein
AK325402	a_96_p127947	2,4105	Heat Shock Transcription Factor 1
AK323040	a_96_p031856	2,7974	Heat Stress Transcription Factor
AI482780	a_96_p129407	-2,1976	High Mobility Group Family
DB717365	a_96_p239233	5,6801	Zinc Knuckle Containing Protein
AW221432	a_96_p154086	2,5543	Homeobox 1 Protein
AK323753	a_96_p180404	2,4210	Homeobox Protein Knotted-1-Like LET12
AW621910	a_96_p158136	2,1172	Lhw (Lonesome Highway) Protein Homodimerization Transcription Activator
			Transcription Factor
AK320303	a_96_p010626	2,3464	Nac Domain Protein Nac2
AK328069	a_96_p020071	2,1541	Nac Domain
AK325499	a_96_p267287	2,0626	Nuclear Acid Binding
BG127254	a_96_p186149	-2,2927	Nucleic Acid Binding
DB682308	a_96_p039026	-2,1313	Pseudo-Response Regulator 7
AW624258	a_96_p159661	-2,3799	Set Domain Protein Sdg117
TA42782_4081	a_96_p256877	2,0247	Tcp Family Transcription
EF091574	a_96_p064496	-2,1353	Transcription Factor TCP3
AK246992	a_96_p108032	-2,2629	Transcription Factor, Putative
	a_96_p192724	-2,5534	Transcription Factor, Putative

DB690881	a_96_p229939	-2,3488	Transcriptional Regulator SUPERMAN
AK324357	a_96_p118562	2,0273	ZFP4 (ZINC FINGER PROTEIN 4) Transcription Factor
AK325141	a_96_p122952	2,2891	Zinc Finger (C3hc4-Type Ring Finger) Family Protein
AK326391	a_96_p235019	2,3838	C3HC4-Type RING Finger Family Protein
AK329557	a_96_p105184	2,6530	C3HC4-Type RING Finger Family Protein
EG553756	a_96_p031056	2,4715	Zinc Finger (C2H2 Type) Family Protein
GH622591	a_96_p061706	2,5074	Zinc Finger (FYVE Type) Family Protein
AK320619	a_96_p004446	2,0819	Zinc Finger Family Protein
BI206593	a_96_p197339	-2,2950	Zinc Ion Binding Protein
AK319447	a_96_p055026	2,5520	Ap2 Domain-Containing Transcription Factor
AK323007	a_96_p219679	2,9626	Ap2 Erf Domain-Containing Transcription Factor/ PTI6
	a_96_p012301	2,8381	
AK320209	a_96_p012306	3,2899	ERF/AP2 Transcription Factor Family (ERF1-Subfamily B-3 )
AK329293	a_96_p138647	4,2990	Wrky Transcription
	a_96_p034636	3,5697	
BI421973	a_96_p040326	3,8655	WRKY Transcription Factor
AK321828	a_96_p084224	2,0235	WRKY Transcription Factor 3
AK325041	a_96_p095769	124,6271	Wrky Transcription Factor 40
	a_96_p022521	31,0395	
	a_96_p253190	24,9655	
BM412776	a_96_p208414	7,7224	WRKY Transcription Factor 6
AW029757	a_96_p143411	7,7781	WRKY Transcription Factor 6
AK322575	a_96_p197639	8,7365	WRKY Transcription Factor 6
	a_96_p044266	8,5334	
	a_96_p091939	8,3180	
	a_96_p166259	7,9231	
	a_96_p189749	7,5346	
	a_96_p247587	6,3687	
AK321664	a_96_p043241	-2,1034	Rna Sigma 70 Subfamily
AK247136	a_96_p105194	4,4875	Rna Polymerase Sigma Factor
AK322155	a_96_p062926	2,1086	DEAD-Box ATP-Dependent RNA Helicase 51
BI422378	a_96_p139262	3,7586	Rna-Dependent Rna Polymerase
BI934417	a_96_p206639	2,2024	RNA Polymerase II C-Terminal Domain Phosphatase-Like 1
<b>Modificazione della parete cellulare</b>			
CD003356	a_96_p225599	-2,2876	Secondary Cell Wall-Related Glycosyltransferase Family 14
AK324020	a_96_p006196	-2,2934	Invertase/Pectin Methylesterase Inhibitor Family Protein
AK324780	a_96_p017911	-2,2105	Pectinesterase
	a_96_p185779	-2,1190	
AK327162	a_96_p024136	-3,2425	Pectin Methylesterase-Like Protein
BE432298	a_96_p172489	-2,0945	Pectinesterase Like Protein
BG130930	a_96_p188159	-3,6144	Alpha-L-Fucosidase 2, Putative
BI207671	a_96_p197719	-2,8851	Pectinesterase Family Protein
BI929062	a_96_p204474	-2,3814	Pectinesterase Family Protein
BW686045	a_96_p054751	-6,8104	Invertase/ Pectin Methylesterase Inhibitor Family Protein
TC215227	a_96_p261142	-2,5679	Pectinesterase/Pectinesterase Inhibitor
AK322096	a_96_p083859	-2,2321	Polygalacturonase-1 Non-Catalytic Subunit Beta
AK328757	a_96_p197064	-2,4283	Glycosyl Hydrolase Family Protein 17

AI778742	a_96_p137207	-2,6359	Glycosyl Hydrolase Family Protein 17
AI896450	a_96_p140277	2,15680	Glycosyltransferase Family Protein 28
AK320987	a_96_p111642	-2,0586	Glycosyltransferase, Cazy Family GT8
AK320428	a_96_p125197	-2,3472	Glycosyltransferase, Cazy Family GT9
AI772225	a_96_p134002	-3,5100	Beta-Expansin Allergen Protein
AK322119	a_96_p210584	-2,2105	Xyloglucan Endotransglucosylase Hydrolase Protein A (XTH)
TA40948_4081	a_96_p097909	2,1592	Kinesin-Like Calmodulin-Binding Protein-Like Protein
BG128069	a_96_p038666	-2,2514	Kinesin Like Protein
AJ784662	a_96_p216624	-3,0459	Leucine-Rich Repeat Extensin-Like Protein 3
BW688483	a_96_p095409	-2,2213	Extensin Class I
GO375427	a_96_p188969	-3,8275	Extensin (Class I)
TC199358	a_96_p251572	-2,0333	Expansin
AW220221	a_96_p153466	-2,1742	Endo-1,4-Beta-Glucanase
BT013085	a_96_p014841	-2,5121	Endo-1,4-Beta-Glucanase, Putative
BE354330	a_96_p171424	-2,8253	Glucan Endo-1,3-Beta-Glucosidase 5
BI932339	a_96_p205774	-3,1366	Alpha- -Glucan-Protein Synthase
AK329103	a_96_p036366	-2,8263	Arabinogalactan-Protein
AK247279	a_96_p163676	2,5859	Arabinogalactan-Protein
TA46353_4081	a_96_p104609	2,1460	Arabinogalactan-Protein
AW218598	a_96_p152511	-2,1255	Classical Arabinogalactan Protein 26
AK321383	a_96_p046236	-2,2108	Lysm Domain-Containing GPI-Anchored Protein 1
AK330003	a_96_p025241	-2,3346	UPF0497 Membrane Protein 12

#### Stress e risposte di difesa

AK326775	a_96_p189264	2,1553	Aldehyde Dehydrogenase
AK325781	a_96_p154431	3,3571	Aldehyde Dehydrogenase
GO376376	a_96_p015511	2,7267	Aldo Keto Reductase Family Protein
TA37168_4081	a_96_p090874	2,0521	Peroxidase 12
BT013077	a_96_p016846	3,6785	Peroxidase 21
AK247309	a_96_p108812	2,0031	Peroxidase 31
AW093103	a_96_p150378	3,4077	Peroxidase 31
AK326852	a_96_p257422	6,1507	Peroxidase 55
	a_96_p023901	5,9177	
TA53912_4081	a_96_p115167	2,8655	Respiratory Burst Oxidase Homolog Protein D
AJ850958	a_96_p096734	2,0759	Alpha-Dioxygenase 2
BI932851	a_96_p045841	-2,0569	Rubredoxin Family Protein
AK323900	a_96_p231949	3,3480	Glutaredoxin
DB680385	a_96_p227489	2,0246	Grx_C3 - Glutaredoxin Subgroup I
BP880842	a_96_p211044	2,2376	Glutathione S-Transferase
TA56135_4081	a_96_p124427	3,4162	Glutathione S-Transferase
TC205975	a_96_p118472	-2,0772	Probable Glutathione-S-Transferase
AW647871	a_96_p161046	-3,6839	Chloroplast Lipocalin
AJ831581	a_96_p143001	-2,5327	Phenylalanine Ammonia-Lyase
AW624595	a_96_p159946	-2,4764	Phenylalanine Ammonia-Lyase
AW031612	a_96_p144576	-2,4654	Phenylalanine Ammonia-Lyase
AK320002	a_96_p076804	-2,2613	Phenylalanine Ammonia-Lyase
	a_96_p151671	-2,4134	
	a_96_p176549	-2,5241	
AK320988	a_96_p032756	-2,0841	Phenylalanine Ammonia-Lyase
TA39417_4081	a_96_p158146	4,2235	14 Kda Proline-Rich Protein

AK322631	a_96_p031971	2,7971	Ankyrin Repeat Family Protein
AK326957	a_96_p059711	2,3012	Ankyrin Repeat Protein
BT013193	a_96_p176989	2,4254	Ankyrin-Repeat Protein HBP1
	a_96_p144951	2,3773	
	a_96_p200389	2,2246	
AK325665	a_96_p042891	-2,4726	Haloacid Dehalogenase-Like Hydrolase Family Protein
BG643147	a_96_p194864	-2,3751	Haloacid Dehalogenase-Like Hydrolase Family Protein
TC208004	a_96_p110232	-2,4975	Hydrolase, Acting On Ester Bonds, Putative
BP904769	a_96_p038636	-3,2640	Hydrolase, Tatd Family Like Protein
TC216255	a_96_p262167	2,5945	Hydrolase-Like Protein
BE459767	a_96_p076304	-3,8211	Proline-Rich Protein
BG127115	a_96_p129182	-6,5147	Putative Proline-Rich Protein
TA39742_4081	a_96_p038201	5,2783	Proline-Rich Protein
AK321989	a_96_p224094	2,2071	Rcd1 (Radical-Induced Cell Death1) Protein Binding
AI775634	a_96_p135537	-3,0515	Stress Enhanced Protein 1
BW690454	a_96_p216199	-2,0387	Stress Enhanced Protein 2
TC205137	a_96_p137617	-2,4357	Snakin-1
AK319807	a_96_p046531	-2,2242	Proteinase Inhibitor I4, Serpin
X04792	a_96_p074929	5,6883	1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase (ACO)
	a_96_p073194	4,1256	
DB691711	a_96_p006091	-2,0999	Major Latex Protein/ Sn-1 Protein/MLP-Like Protein 43
ES895133	a_96_p204889	-8,7865	Major Latex-Like Protein
ES897266	a_96_p112362	-7,0430	Major Latex-Like Protein
DV105669	a_96_p025741	-3,2043	Major Latex-Like Protein
ES894377	a_96_p080589	-2,1769	Major Latex-Like Protein
AF146690	a_96_p012966	-3,4619	Pto-Responsive Gene 1 Protein
	a_96_p117212	-2,0278	
TA49616_4081	a_96_p107904	-2,5777	Subtilisin-Like Protease
AK327104	a_96_p018061	-2,1346	Subtilisin-Like Protease
BP909465	a_96_p222234	-4,2357	Subtilisin-Like Serine Protease
AK323732	a_96_p010533	-8,7284	Acid Phosphatase 1
AW031841	a_96_p144726	2,1245	Class I Chitinase
GO373278	a_96_p011656	2,3761	Class I Chitinase
	a_96_p145481	2,3109	
BW692302	a_96_p224389	-2,7130	Disease Resistance Response Protein, Putative
AK320214	a_96_p042676	-2,4735	Germin-Like Protein
AW031931	a_96_p144781	-2,9675	Hydroxyproline-Rich Glycoprotein
BI927328	a_96_p203654	-2,0514	Hydroxyproline-Rich Glycoprotein Family Protein
AK328844	a_96_p118572	39,4539	Nimin2c Protein
AW621313	a_96_p157776	-3,6492	Basic 7s Globulin 2 Precursor Small
AY656837	a_96_p017316	2,2499	Arginase 1
SLU37840	a_96_p077809	-2,0321	Lipoxygenase (Loxd)
AK323624	a_96_p265847	2,7954	Leucine Aminopeptidase
BI925947	a_96_p202714	-2,6749	Polyphenol Oxidase (PPO)
BI931371	a_96_p074099	-2,0704	Polyphenol Oxidase (PPO)
M61914	a_96_p034156	-3,6173	Threonine Deaminase
AW040514	a_96_p079634	-4,5994	Type I Serine Protease Inhibitor
TA38240_4081	a_96_p093065	7,6008	Wound-Induced Proteinase Inhibitor 1
	a_96_p132237	6,9214	

TC194170	a_96_p012086	-3,1810	Serine Carboxypeptidase I Precursor-Like Protein
AK324132	a_96_p016366	-2,3989	Pollen-Specific Protein C13
BG628721	a_96_p192914	-2,1621	Dehydration-Responsive Family Protein
AK319410	a_96_p228864	-2,1355	Late Embryogenesis Abundant Protein
DB681086	a_96_p057431	-2,2796	Chaperone Protein Dnaj-Related
AY128100	a_96_p012671	-3,1304	Chloroplast Small Heat Shock Protein
AK247913	a_96_p111177	-2,0193	Dnaj Heat Shock N-Terminal Domain-Containing
BP906933	a_96_p220914	4,3882	DNAJ Heat Shock N-Terminal Domain-Containing Protein AHM1
BI926536	a_96_p203134	2,1184	Dnaj-Like Protein
TA36583_4081	a_96_p089339	2,1889	Dnaj-Like Protein
	a_96_p167409	2,1516	
AI895389	a_96_p139717	2,8956	Dnaj-Like Protein
AW034680	a_96_p146436	3,3023	Dnaj-Like Protein
AF124139	a_96_p089350	2,1139	Dnaj-Like Protein [Solanum Lycopersicum]
TA36588_4081	a_96_p156591	2,1551	Dnaj-Like Protein [Solanum Lycopersicum]
AK322237	a_96_p146916	-2,1273	Heat Shock Protein 70 -Interacting
	a_96_p258612	-2,1476	
AK325083	a_96_p196374	-2,1594	Heat Shock Protein Binding
BI921309	a_96_p200214	-2,0455	Mitochondrial Small Heat Shock Protein
BT012973	a_96_p000936	2,7994	Wound-Induced Protein Win2
	a_96_p128672	2,7851	
BI206052	a_96_p197109	2,4025	Harpin Binding Protein 1
AK323201	a_96_p140062	3,8754	Harpin-Induced Hin1-Related Harpin-Responsive
AK322218	a_96_p032201	2,2661	RPM1-Interacting Protein 4 (RIN4)
BW688678	a_96_p084954	7,4137	Pathogenesis Related Protein PR-1(P4)
Y08804	a_96_p139547	3,9264	Pathogenesis-Related Leaf Protein 6
AK324158	a_96_p143681	5,5139	Pathogenesis-Related Protein 1 (PR1)
	a_96_p077619	5,2598	

---

**Trasduzione del segnale**


---

BG629203	a_96_p254627	-2,0216	Hypoxia-Responsive Family Protein
AW649009	a_96_p077109	-2,7413	Auxin-Regulated Protein
EG553702	a_96_p248907	-3,2498	Auxin-Responsive Family Protein
AK247175	a_96_p143346	2,0340	F-Box Family Protein
AA824764	a_96_p129017	2,3491	F-Box Family Protein
AW934258	a_96_p007561	2,7703	F-Box Family Protein
	a_96_p261402	2,2911	
BW688181	a_96_p084569	-2,0115	Glycine-Rich Protein
AW621499	a_96_p157891	-3,5972	Gpi-Anchored Protein
DB717894	a_96_p024096	2,4234	GTP Binding Protein
BP880647	a_96_p210949	3,5434	Interferon-Induced GTP-Binding Protein Mx, Putative
AW030223	a_96_p143756	9,2125	Lectin Protein Kinase Family Protein
DB684300	a_96_p059491	4,4886	Leucine Rich Repeat Family Protein, Expressed
AW220160	a_96_p153416	-2,0789	Lrr Receptor Protein Kinase, Putative
AJ457050	a_96_p013363	-2,0674	Nbs-Lrr Resistance Protein
AK327102	a_96_p176959	2,7067	Phox Domain-Containing Protein
BI928789	a_96_p204319	2,1285	Prosystemin
AK328126	a_96_p244200	2,0091	Protein AUXIN RESPONSE 4
AK328334	a_96_p063091	-2,3146	Protein Phosphatase 2c
AK247046	a_96_p111607	-2,2074	Protein Phosphatase 2c Containing Expressed

AK248004	a_96_p104924	2,5774	Protein Phosphatase Regulatory
AK319177	a_96_p021926	-2,7680	Protein Phosphatase Regulatory
AK321860	a_96_p060726	2,4100	Protein-Protein Interaction Regulator Family Protein
TA37526_4081	a_96_p247557	-7,899	Ras-Related Gtp-Binding Protein
BW687921	a_96_p058601	-2,6776	Seven-Transmembrane-Domain Protein 1
TC214608	a_96_p110427	-2,3318	Sit4 Phosphatase-Associated Family Protein
BP909921	a_96_p222429	-2,6290	S-Locus-Specific Glycoprotein S13
AI777568	a_96_p136652	2,4249	S-Locus-Specific Glycoprotein S6 Precursor, Putative
DB710856	a_96_p235094	3,6404	Strubbelig Receptor Family 3
AK322128	a_96_p106004	2,6854	Tir-Nbs-Lrr Resistance Protein
AK327787	a_96_p102239	2,8189	Tir-Nbs-Lrr Resistance Protein
AK322079	a_96_p227354	2,9112	Brassinosteroid Insensitive 1-Associated Receptor Kinase 1
	a_96_p067046	2,4166	
TA46533_4081	a_96_p028486	2,2112	Shaggy-Like Kinase 59
AK326587	a_96_p261322	2,2204	Shaggy-Like Protein Kinase
TC208463	a_96_p255467	-3,7370	Gibberellin-Regulated Protein 1
TA56201_4081	a_96_p124682	-7,0598	Gibberellin-Regulated Protein 5 (GASA5)
TA39684_4081	a_96_p037776	2,7019	ATP/GTP/Ca++ Binding Protein
TA37039_4081	a_96_p090559	3,9460	Gtp-Binding Family Protein
TC212792	a_96_p114937	-3,0401	Gtp-Binding Protein
AK326531	a_96_p173644	2,0023	Gtp-Binding Protein
TC213305	a_96_p012261	2,3273	Gtp-Binding Protein
DB682801	a_96_p059646	2,8398	Gtp-Binding Protein
AK324650	a_96_p069141	2,1108	AMP-Activated Protein Kinase
AK320480	a_96_p042406	2,1804	CBL-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 23
AK322396	a_96_p158326	2,6368	Leucine-Rich Repeat Family Protein / Protein Kinase Family Protein
	a_96_p096844	2,4535	
DB702728	a_96_p071289	2,0108	Calcium Dependent Protein Kinase
BG127290	a_96_p051966	-2,4373	Calcium-Binding EF-Hand
AI482775	a_96_p129397	2,0383	Calcium-Dependent Protein Kinase
BI935576	a_96_p029186	2,5477	Calcium-Dependent Protein Kinase
AW648966	a_96_p161761	2,0654	Calmodulin Binding
AK322916	a_96_p061651	2,6159	Calmodulin Binding Protein
TC204564	a_96_p129012	-3,0401	Calmodulin Binding Protein, Putative
BG126746	a_96_p185919	-2,1424	Calmodulin Binding Protein, Putative
AW929606	a_96_p165851	-2,2007	Calmodulin-Binding Heat-Shock Protein
AK321949	a_96_p183724	2,4425	Calmodulin-Binding Protein
AK321297	a_96_p039886	-2,0943	Calmodulin-Like Protein
AK327536	a_96_p037516	5,4597	Calmodulin-Like Protein 41
AF118844	a_96_p228119	2,8272	Ethylene Receptor Homolog (ETR5)
AY359965	a_96_p007401	3,0773	Ethylene-Inducing Xylanase Receptor 1 (EIX 1)
AK328487	a_96_p189269	-2,0900	Leucine-Rich Repeat Transmembrane Protein Kinase
TA51879_4081	a_96_p110227	2,3131	Map Kinase
TA44423_4081	a_96_p177644	-3,6568	MAP Protein Kinase
BI924417	a_96_p201779	2,8341	MAP3K Delta-1 Protein Kinase
AW032450	a_96_p145011	-2,0619	Mapkk
BP901840	a_96_p219429	-2,1248	Phosphatidylinositol-4-Phosphate5-Kinase Protein (PIP5K1)
AK323436	a_96_p066266	-2,5250	Phototropic-Responsive Nph3 Family Protein
AF154003	a_96_p012826	-2,5901	Pirin-Like Protein (Cam-Binding Proteins)



BG127461	a_96_p058651	2,16023	Protein Kinase
BG126596	a_96_p185879	-2,2770	Protein Kinase Family Protein
DV105380	a_96_p247312	-2,0579	Protein Kinase Family Protein
BP903297	a_96_p219869	-2,3807	Protein Phosphatase 2C Family Protein
DB707781	a_96_p233704	2,4561	Receptor Protein Kinase Clavata1
BP885350	a_96_p212799	2,0935	Receptor Serine-Threonine Protein Kinase, Putative
BT013501	a_96_p017796	2,1919	Receptor-Like Protein Kinase
TA48642_4081	a_96_p160356	6,1459	Receptor-Like Protein Kinase, Putative
AW928656	a_96_p165166	-2,0993	Ser Thr Specific Protein Kinase-Like Protein
BE353795	a_96_p170969	-2,3255	Ser Thr Specific Protein Kinase-Like Protein
AK326679	a_96_p006231	-2,4222	Serine Threonine-Protein Kinase
BG629316	a_96_p003841	-2,0440	Serine/Threonine-Protein Kinase
AK247069	a_96_p149606	3,0069	Serine/Threonine-Protein Kinase Bri1
TC212746	a_96_p258672	-2,9453	Short Chain Alcohol Dehydrogenase
AW222876	a_96_p154671	-2,8225	Short Chain Alcohol Dehydrogenase
ES895478	a_96_p085620	-2,2129	Short Chain Alcohol Dehydrogenase
DB714564	a_96_p051606	2,0046	Short-Chain Dehydrogenase/Reductase Family Protein
BM412451	a_96_p041216	-2,8115	Short Chain Alcohol Dehydrogenase
BG124286	a_96_p184844	-2,8902	Short Chain Alcohol Dehydrogenase, Putative
TA37801_4081	a_96_p092229	-2,0874	Short-Chain Dehydrogenase
TC201777	a_96_p122282	-3,2201	Short-Chain Dehydrogenase Reductase Family Protein
BI931465	a_96_p048926	-2,3563	Short-Chain Dehydrogenase Reductase Family Protein
AK328694	a_96_p020996	2,5220	Short-Chain Dehydrogenase Reductase Family Protein
	a_96_p157301	2,2709	

#### Fotosintesi

AK319426	a_96_p067196	2,3999	Cu2+ Plastocyanin-Like
BE460852	a_96_p178304	-2,3703	Nadh Dehydrogenase Subunit 5
TC204303	a_96_p127272	-2,9221	Plastocyanin-Like Domain-Containing Protein
AI483641	a_96_p129757	2,1320	ATP Synthase F0 Subunit 6
AK319541	a_96_p033821	-2,3052	Chlorophyll A B-Binding Protein
BG628539	a_96_p005921	-3,4094	Chlorophyll A/B Binding Protein, Putative
AK319524	a_96_p221219	-2,2254	Chlorophyll A-B Binding Protein 4 Precursor Homolog
AK319579	a_96_p034016	-2,0797	Chlorophyll A-B Binding Protein 4 Precursor Homolog
TC243979	a_96_p261917	-2,4833	Chloroplast Chlorophyll A B Binding Protein
GO375339	a_96_p088019	-2,3093	Chloroplast Oxygen-Evolving Protein 16 Kda Subunit
	a_96_p150616	-2,0977	
TA37468_4081	a_96_p091544	-2,6853	Cytochrome B6f Complex Subunit
TA37470_4081	a_96_p220229	-2,3489	Cytochrome B6f Complex Subunit
BI423085	a_96_p199829	-2,1643	Cytochrome C Biogenesis Protein
AK325991	a_96_p054981	-2,1532	Glycolate Oxidase
BG643749	a_96_p195139	-2,7074	Negatively Light-Regulated Expressed
AW094083	a_96_p088834	-2,0722	Oxygen Evolving Enhancer Protein 3
DB721093	a_96_p075989	-2,1650	Photosystem I Reaction Center Subunit IV A, Chloroplastic
	a_96_p216719	-2,4092	
AK323838	a_96_p010426	-2,3540	Photosystem II Oxygen-Evolving Complex Protein 3
AW093610	a_96_p150591	-2,7299	Photosystem II Reaction Center W Chloroplast
AK322365	a_96_p053906	3,3637	Reductasemetchrome-Associated Protein 1
DB706287	a_96_p134742	-2,1874	Plastoquinol-Plastocyanin Reductase, Putative
BT012732	a_96_p010331	-2,0614	Protochlorophyllide Reductase Precursor

AW037505	a_96_p148151	-2,2344	Ribulose Bisphosphate Carboxylase
DB708884	a_96_p060116	-2,0087	Thylakoid Lumenal 20 Kda Protein
AK319630	a_96_p047801	-2,9341	Thylakoid Lumenal 17.9 Kda Protein
DB714570	a_96_p046166	-2,6028	Thylakoid Membrane Phosphoprotein 14 Chloroplast
AK320174	a_96_p134442	-2,4385	Glycine Decarboxylase Multi-Enzyme H Subunit
	a_96_p148166	-2,8975	
	a_96_p161016	-2,5114	
	a_96_p227414	-2,7492	
AK324069	a_96_p059256	-2,1016	Serine Hydroxymethyltransferase
	a_96_p092019	-2,0442	
<b>Metabolismo primario</b>			
DB718108	a_96_p033071	2,3373	Beta-Amylase PCT-BMYI
AK324456	a_96_p207859	2,0622	Beta-Fructofuranosidase
DB716846	a_96_p079424	2,7104	Beta-Fructofuranosidase
EU908574	a_96_p174529	-2,1883	Glucan Water Dikinase
TC212596	a_96_p120367	-2,2179	Glucose Phosphomutase
AI484173	a_96_p076849	-2,4335	Phosphoglucomutase, Chloroplastic
TC212533	a_96_p258485	-5,3197	Sucrose Synthase
AK325807	a_96_p091130	-2,3428	Sucrose Synthase
AW033697	a_96_p145886	-2,6888	Probable Carbohydrate Esterase
BF050612	a_96_p112977	-2,6211	Probable Carbohydrate Esterase
AK320967	a_96_p049681	-2,6885	Methylenetetrahydrofolate Reductase
	a_96_p195099	-2,5975	
TA41125_4081	a_96_p182754	2,07553	UDP-Arabinose 4-Epimerase 1
BF097667	a_96_p182074	2,1217	Atp Binding Protein
AW616042	a_96_p157666	-2,9614	Beta-Galactosidase
AJ849376	a_96_p186984	-4,1746	Carbonic Anhydrase
	a_96_p207231	-3,3783	
AK246699	a_96_p019451	2,0094	Phosphoglycerate/Bisphosphoglycerate Mutase Family Protein
AW036274	a_96_p058916	-2,4784	Succinate Dehydrogenase Subunit 3
AW442772	a_96_p156442	-3,6609	UDP-Glucuronosyltransferase
ES896973	a_96_p252053	-2,3822	UDP-Glucuronosyltransferase, Putative
TC204341	a_96_p025101	-2,3206	Alpha-Xylosidase Precursor
BM412691	a_96_p039636	2,1099	Udp-Galactose 4-Epimerase-Like Protein
TA54371_4081	a_96_p117122	2,3570	Udp-Galactose 4-Epimerase-Like Protein
AW443936	a_96_p057626	-2,7930	Lipid Binding
AW648935	a_96_p161746	-3,4241	Lipid Binding Protein
GO373180	a_96_p048121	-2,1562	Lipid Transfer Protein Family Protein
BG642438	a_96_p058286	2,4519	Oxysterol-Binding Protein
AK321666	a_96_p047671	-4,2444	Fatty Acyl-CoA Reductase 3
DB723516	a_96_p243319	2,5375	Glycerophosphoryl Diester Phosphodiesterase Family Protein
AK325632	a_96_p154976	3,1396	Lipase Class 3 Family Protein
BT014279	a_96_p005026	-2,0676	Monoglyceride Lipase, Putative
AK324959	a_96_p021571	-2,3587	GDSL-Motif Lipase/Hydrolase Family Protein
	a_96_p171844	-2,4927	
	a_96_p177824	-2,4870	
	a_96_p211839	-2,3887	
	a_96_p212469	-2,2136	
BW691510	a_96_p224299	2,2112	GDSL-Motif Lipase/Hydrolase Family Protein

AK324284	a_96_p063711	-2,1597	Phospholipase-Like Protein
ES897064	a_96_p080374	-2,7539	3-Hydroxyisobutyryl-Coenzyme A Hydrolase
BE460155	a_96_p177944	-2,1615	GDSL Esterase/Lipase
AK329762	a_96_p129367	-3,2933	GDSL Esterase/Lipase 5
AK323114	a_96_p169144	-2,4674	Cyclase Dehydrase
TC204291	a_96_p134507	-2,0910	Cyclase Dehydrase
TA41730_4081	a_96_p099034	-2,5036	Cyclase/Dehydrase
AK321434	a_96_p080534	-2,6368	Delta-6 Desaturase
AW219947	a_96_p025206	3,5692	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase SDP6, Mitochondrial
AK329218	a_96_p025892	2,2224	Lpp3 (Lipid Phosphate Phosphatase 3) Phosphatidate Phosphatase
BI931461	a_96_p060136	-2,2007	Squalene Monooxygenase
AJ786362	a_96_p021271	-2,9167	Steroid 5 Alpha Reductase DET2 (Det2 Gene)
AK320679	a_96_p039631	-2,1166	Sterol C-14 Reductase
TA38534_4081	a_96_p234954	2,1213	Sterol Delta-7 Reductase
AI780490	a_96_p138012	3,7714	3-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase I
ES895349	a_96_p188729	-2,0566	Acetyl-Coa Synthetase
BT013389	a_96_p017536	-2,3994	Acyl:Coa Ligase Acetate-Coa Synthetase-Like Protein
AK247484	a_96_p027831	-2,2222	C-4 Sterol Methyl Oxidase
AK319912	a_96_p061396	2,0150	Long-Chain-Fatty-Acid Coa Ligase
AK325328	a_96_p162316	-2,3393	Udp-Glucose:Sterol Glucosyltransferase
<b>Metabolismo proteico</b>			
AK321240	a_96_p046551	2,1056	Calreticulin
AK321403	a_96_p029511	-2,0275	Fkbp-Type Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase 4
AK325223	a_96_p080224	2,1246	T-Complex Protein 1 Subunit Delta (Chaperonine)
AK326667	a_96_p178444	-2,5567	Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase
BI421986	a_96_p140472	2,2304	Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase
DB710078	a_96_p038896	-3,1816	Glycine Dehydrogenase
AK328103	a_96_p172209	-2,8678	Histidine Decarboxylase
	a_96_p243089	-2,8802	Histidine Decarboxylase
TC244805	a_96_p262572	-2,6718	Histidine Decarboxylase
BE436113	a_96_p173789	-2,3965	Histidine Decarboxylase
	a_96_p183239	-2,7862	
TC207233	a_96_p254817	-2,0709	Histidine Decarboxylase
AI780433	a_96_p033291	4,0922	Lysine Ketoglutarate Reductase Trans-Splicing Related 1-Like
DB720017	a_96_p032856	-2,3735	Phosphoserine Aminotransferase
AJ312204	a_96_p174384	2,4264	Putative Urease Accessory Protein D
BM413177	a_96_p089244	-2,1849	Serine Decarboxylase
	a_96_p258542	-2,7269	
AK323119	a_96_p173359	2,0660	26s Proteasome Regulatory Particle Triple-A Atpase Subunit6
TA48375_4081	a_96_p106514	2,8579	Aspartic-Type Endopeptidase/ Peptidase
FS198172	a_96_p056276	-2,3242	Aspartic Proteinase Nepenthesin-1
AK325513	a_96_p057541	7,5315	Aspartic Proteinase Nepenthesin-2
AK319513	a_96_p044201	-4,9614	Aspartyl Protease
BP907482	a_96_p221259	-2,4743	Aspartyl Protease Family Protein
AW219849	a_96_p153256	2,2563	Metalloendopeptidase
AK323757	a_96_p236909	2,5018	Serine Endopeptidase
BP910116	a_96_p222524	-2,0243	Ca-Dependent Cysteine-Type Endopeptidase
BG129702	a_96_p023236	-2,3846	Xylem Serine Proteinase 1
BG127525	a_96_p056301	-2,3658	Autophagocytosis-Associated Family Protein

AK320982	a_96_p070369	-2,8733	Peroxisomal Biogenesis Factor 6
AK324607	a_96_p073024	2,1009	E3 Ubiquitin-Protein Ligase _RHC2A (RING-H2 Finger C2A)
AK325161	a_96_p042991	-2,1028	E3 Ubiquitin-Protein Ligase ATL41
	a_96_p114557	-2,1478	
AK326989	a_96_p007036	2,7698	E3 Ubiquitin-Protein Ligase RMA1H1
AW624783	a_96_p160076	4,0530	Ubiquitin Carboxyl-Termina Hydrolase Family Protein
BT013660	a_96_p135202	-3,7830	Ubiquitin Family Expressed
AK327785	a_96_p125672	-2,4081	Ubiquitin Ligase E3 Alpha,
AI894983	a_96_p139532	-2,1514	Ubiquitin-Activating Enzyme
BG628277	a_96_p192634	2,3554	Ubiquitin-Conjugating Enzyme 13
BI925250	a_96_p202249	2,4020	Ubiquitin-Protein Ligase, Putative
DB712160	a_96_p153811	2,5643	Zinc Finger (Ubiquitin-Hydrolase) Domain-Containing Protein
BP888159	a_96_p213934	-4,9211	RING-H2 Finger Protein ATL2B
AK326893	a_96_p069269	2,0112	Tetratricopeptide Repeat-Containing Protein
TA39442_4081	a_96_p025681	2,2932	Protein Phosphatase
AK320530	a_96_p227744	2,9971	Histidine Trna 5 -Guanylyltransferase
AI488941	a_96_p132112	2,5242	Trna Pseudouridine Synthase
DB684219	a_96_p070134	2,1138	Trna Pseudouridine Synthase 3
AK323194	a_96_p058521	3,3288	Tryptophanyl-Trna Synthetase
GO372642	a_96_p041911	-2,9759	50s Ribosomal Protein L3
AI486966	a_96_p055576	-3,5236	60s Ribosomal Protein L28
TC194965	a_96_p024701	-2,0281	Prpl11 (Plastid Ribosomal Protein L11)
AK329926	a_96_p028441	2,4705	Ribosome Maturation Protein SBDS (Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome)
AW737871	a_96_p026771	-2,0874	Trz4 (Trnase Z 4) 3 -Trna Processing Endoribonuclease Catalytic
DB715015	a_96_p259932	2,7198	Ribosomal Protein S16
TC213334	a_96_p259227	2,3791	Ribosomal Protein S18
AK319406	a_96_p075304	2,2115	Ribosomal Protein S6-Like Protein
AJ785394	a_96_p027631	2,0314	Ribosomal RNA Assembly Protein Mis3, Putative
<b>Metabolismo secundario</b>			
AK327872	a_96_p236018	2,0237	UDP-Glucose: Anthocyanidin 3-O-Glucosyltransferase
AK320848	a_96_p004291	-3,1661	4,5-DOPA Dioxygenase Exradiol-Like Protein
AK320064	a_96_p145271	-2,4357	Allantoinase, Putative
TC199713	a_96_p251672	-2,3529	Allantoinase, Putative
AK323887	a_96_p083929	-2,6685	Methylketone Synthase Ib
	a_96_p231909	-2,7543	
AK330033	a_96_p043226	-2,2983	Multicopper Oxidase
TA36766_4081	a_96_p089884	-2,5038	Arginine Decarboxylase
AK246988	a_96_p080209	-2,4529	Arginine Decarboxylase
TA36764_4081	a_96_p089879	-2,3559	Arginine Decarboxylase
AW979587	a_96_p170014	-2,5971	Lac6 (Laccase 6) Laccase
TA43614_4081	a_96_p086429	2,2263	Cyp92b21
AK326158	a_96_p036806	-2,5888	Cytochrome P450
AK323147	a_96_p230979	-2,4380	Cytochrome P450
TA36864_4081	a_96_p090144	2,1248	Cytochrome P450
BG124625	a_96_p076409	2,4004	Cytochrome P450
TC212704	a_96_p258647	2,6541	Cytochrome P450
AK320760	a_96_p078329	2,1169	Cytochrome P450 Monooxygenase
AI774414	a_96_p134967	2,5728	Cytochrome P450-Like Protein
BI925349	a_96_p202329	-2,1907	S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase (SAH Hydrolase)

AW944984	a_96_p169729	-3,1672	Anthocyanin Acyltransferase
AK319704	a_96_p094299	-2,3868	Anthocyanin Acyltransferase
Z18277	a_96_p012586	-14,7486	Dihydroflavonol 4-Reductase
BI932492	a_96_p164006	-2,1709	Dihydroflavonol Reductase
BG631523	a_96_p194234	-2,0654	Flavonoid 3 5 -Hydroxylase-Like Protein
BT014384	a_96_p172669	2,3054	Flavonol Synthase/Flavanone 3-Hydroxylase
TC214745	a_96_p260587	2,1797	Gtp Cyclohydrolase
BI935129	a_96_p040226	-2,3257	1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase
AK327299	a_96_143661	-2,3346	Mevalonate Diphosphate Decarboxylase
	a_96_p172954	-2,1026	
	a_96_p240924	-2,0154	
DB699912	a_96_p003616	-2,5377	Undecaprenyl Diphosphate Synthase
AK324568	a_96_p112237	-2,1299	Anthranilate N-Benzoyltransferase
BE431646	a_96_p171999	-2,2534	Cinnamic Acid 4-Hydroxylase
AK322502	a_96_p229784	-2,4277	Phenylcoumaran Benzylic Ether Reductase -Like Protein
AK324859	a_96_p124417	-7,3537	Trans-Caffeoyl-CoA 3-O-Methyltransferase-Like Protein
AK328438	a_96_p073909	-2,0544	4-Coumarate: Ligase
	a_96_p219414	-3,4542	
TC191942	a_96_p000656	-2,5072	Spermidine Synthase
AW624068	a_96_p088139	-2,0073	Hyoscyamine 6 Beta-Hydroxylase
	a_96_p164736	-2,8134	
	a_96_p201834	-2,6415	
AK327649	a_96_p074339	-2,0131	Nicotinate Phosphoribosyltransferase-Like Protein
AK326535	a_96_p167819	-5,1606	Dimethylaniline Monooxygenase
AK321218	a_96_p247512	-2,4249	Dimethylaniline Monooxygenase, Putative
AK326781	a_96_p262162	2,4737	Reticuline Oxidase Precursor
AF261141	a_96_p000021	-2,1362	Strictosidine Synthase Family Protein
BI932154	a_96_p205704	-6,8024	Tropinone Reductase I
BG627719	a_96_p192319	-9,2632	Tropinone Reductase li
AI487426	a_96_p039806	-7,7813	Ornithine Decarboxylase
AK320212	a_96_p076309	-2,1202	S-Adenosyl-L-Methionine Synthetase
AK247414	a_96_p107614	-2,7350	Zeatin O-Glucosyltransferase
TC211954	a_96_p125112	-2,8562	Putative Cis-Zeatin O-Glucosyltransferase
BT014540	a_96_p093374	-9,4335	Zeatin O-Glucosyltransferase
	a_96_p163901	-8,5833	
	a_96_p214539	-9,1498	

#### Trasporto

BE435076	a_96_p154701	2,3015	Atp-Binding Cassette
TC211361	a_96_p257517	2,3302	Auxin Efflux Carrier Family Protein
AK325256	a_96_p238712	3,2309	Mitochondrial Substrate Carrier Family Protein
AK323143	a_96_p006521	2,1745	Nitrate Transporter
AK328044	a_96_p039891	2,1729	Phosphoglyceride Transfer Family Protein
BE435517	a_96_p174509	2,3273	ADP/ATP Translocase 1
AK324317	a_96_p100969	2,3221	Atp Carrier-Like Protein
BW688942	a_96_p122052	-2,3451	Tom5 (Mitochondrial Import Receptor Subunit Tom5 Homolog)
AK324410	a_96_p071049	2,4773	Transporter, Putative
DB719071	a_96_p028676	2,4233	Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 41 Homolog
AK322959	a_96_p043716	2,3397	Coatomer Protein Complex, Subunit Beta 2 (Beta Prime)
DB714933	a_96_p237712	2,5035	Amino Acid Transporter

BG626093	a_96_p001911	-2,5749	Lysine Histidine Transporter
TA40566_4081	a_96_p216854	2,3700	CAX-Interacting Protein 4
	a_96_p084634	2,2584	
AW038563	a_96_p148541	-3,1489	Electron Transporter, Putative
AK321239	a_96_p072844	-2,1678	Non-Specific Lipid Transfer Protein
BW685140	a_96_p038271	-2,1337	Aquaglyceroporin; Tonoplast Intrinsic Protein (Tipa)
EG553320	a_96_p051746	-2,0127	ATPase, Coupled To Transmembrane Movement Of Substances / Cadmium Ion Transmembrane Transporter
	a_96_p074659	-2,2175	
	a_96_p096869	-2,0706	
TC202250	a_96_p051941	-3,5352	Boron Transporter
AK329744	a_96_p009926	2,5290	Metal Ion Binding
AK247049	a_96_p037016	19,9180	Metal Ion Binding Protein, Putative
AK325211	a_96_p051031	2,0345	Proton-Dependent Oligopeptide Transport Family Protein
AK322276	a_96_p037116	-5,4520	Sulfate Transporter
AK329464	a_96_p187999	-2,2229	Lysine Histidine Transporter
TC197326	a_96_p251022	6,2031	GPT1 (Glucose-6-Phosphate Transporter 1)
TC193839	a_96_p003421	-2,3912	Triose Phosphate/Phosphate Translocator
AK326082	a_96_p061671	2,5987	Protein ABC1, Mitochondrial
	a_96_p171539	2,5979	

---

**Funzione sconosciuta**

---

BT013533	a_96_p017901	2,8255	Ac007727_10 Ests Gb
BT014116	a_96_p102754	2,2059	Acr3 Amino Acid Binding
AK321821	a_96_p027491	2,2734	Acr8 Amino Acid Binding
	a_96_p145446	2,0425	
AW034273	a_96_p036276	-2,0534	At5g52030 Msg15_11
TA42123_4081	a_96_p223754	-2,4971	Brain Protein 44
DV105382	a_96_p247317	2,0942	Camphor Resistance Crcb Family Protein
AK326230	a_96_p122322	-10,0140	Conserved Hypothetical Protein
AK328761	a_96_p189744	-2,2095	Conserved Hypothetical Protein
AK246306	a_96_p103524	-3,4797	Downward Leaf Curling Protein
BI926552	a_96_p021911	2,4360	Frigida-Essential 1/FES1
TA37617_4081	a_96_p249552	2,6230	GDA2 Protein
BM410860	a_96_p207994	2,0863	Hyphally-Regulated Cell Wall Protein
AK328085	a_96_p243894	5,1142	Hypothetical Protein
AK328929	a_96_p117882	2,9725	Hypothetical Protein
TC212857	a_96_p258777	-3,5196	Hypothetical Protein
BG643900	a_96_p195199	3,0480	Hypothetical Protein
BI423345	a_96_p199944	2,0311	Hypothetical Protein
BI923920	a_96_p201434	-2,2794	Hypothetical Protein
AK322107	a_96_p124102	-2,8899	Integral Membrane Family Protein
TA52014_4081	a_96_p110422	2,0365	Joka2
AK247903	a_96_p100479	2,3907	Lupus La Ribonucleoprotein
AK247865	a_96_p179534	4,0399	Membrane Protein-Like Protein
	a_96_p190534	2,8945	
EG553347	a_96_p031006	-2,0513	Mpv17 Protein
AK247133	a_96_p096364	2,7739	Nli Interacting Factor Family Protein
	a_96_p044256	2,0890	
AK324131	a_96_p219679	2,9626	Pm27 Protein

	a_96_p042306	2,6268	
	a_96_p189489	2,5783	
BW687410	a_96_p252147	3,7125	Pollen-Specific C2 Domain Containing Protein
	a_96_p084839	3,1761	
AK325730	a_96_p068951	2,3007	Polypeptide With An Integrase Domain
AK320422	a_96_p069849	2,1420	Predicted Protein
BG125347	a_96_p185269	-2,5871	Predicted Protein
AK247965	a_96_p112392	-2,2899	Predicted Protein
ES896197	a_96_p04730	-2,2770	Predicted Protein
TC204355	a_96_p135672	-2,1412	Predicted Protein
TA43484_4081	a_96_p101294	3,9952	Protein
	a_96_p233229	3,4077	
AK322596	a_96_p207589	3,6146	Protein
DB712420	a_96_p236078	2,9164	Protein
BP906424	a_96_p220699	2,4580	Protein
AK322057	a_96_p130562	2,4518	Protein
AK321221	a_96_p022061	2,4505	Protein
FS193948	a_96_p062556	2,3346	Protein
AK247490	a_96_p103374	2,3057	Protein
AK319947	a_96_p072199	2,2988	Protein
AK326970	a_96_p04570	2,2374	Protein
TA56893_4081	a_96_p042506	2,2031	Protein
AK247507	a_96_p178219	2,1967	Protein
DB684053	a_96_p059611	2,1721	Protein
TA39567_4081	a_96_p043691	2,1506	Protein
BT014183	a_96_p146461	2,0856	Protein
AW934461	a_96_p169334	2,0705	Protein
AK320600	a_96_p101964	2,0438	Protein
	a_96_p247582	2,0400	
DB719415	a_96_p066001	2,0414	Protein
BW685530	a_96_p035761	2,0332	Protein
AW033294	a_96_p145601	2,0083	Protein
AI773375	a_96_p134312	2,0067	Protein
AW625481	a_96_p160411	-3,8821	Protein
TA40495_4081	a_96_p097179	-3,7872	Protein
TC198038	a_96_p046406	-3,0757	Protein
AK246966	a_96_p060951	-3,0711	Protein
AK329630	a_96_p016761	-2,9683	Protein
	a_96_p058786	-2,9063	
AK329241	a_96_p161666	-2,7271	Protein
BI931792	a_96_p205529	-2,6067	Protein
BG128121	a_96_p046961	-2,4476	Protein
AW625905	a_96_p160586	-2,3766	Protein
AK325642	a_96_p212189	-2,2291	Protein
BW689408	a_96_p053276	-2,1487	Protein
BI422593	a_96_p036701	-2,1465	Protein
AK247845	a_96_p250412	-2,1462	Protein
GO374096	a_96_p028706	-2,1298	Protein
AK248009	a_96_p238407	-2,1096	Protein

TC204374	a_96_p099659	-2,0520	Protein
AK326020	a_96_p106339	-2,0156	Protein
BT013940	a_96_p066851	-2,0028	Protein
AK319287	a_96_p062501	3,7749	Protein Binding
AK322843	a_96_p057671	3,4699	Protein Binding
BE450239	a_96_p175759	2,3670	Protein Binding
TA50107_4081	a_96_p108397	2,4363	Putative Selenium-Binding Protein, Related
BF050153	a_96_p262067	2,3482	Putative Uncharacterized Protein
TA49196_4081	a_96_p107424	-4,4283	Tumor-Related Protein
ES897358	a_96_p107419	-2,0272	Tumor-Related Protein
BF096396	a_96_p180899	5,3064	Unknown
AK247170	a_96_p063966	3,3831	Unknown
AK327751	a_96_p009086	3,4980	Unknown
DV105550	a_96_p054841	-2,2759	Unknown
AK323338	a_96_p094264	-2,0771	Unknown
BG133959	a_96_p190034	-2,1442	Unknown
TA44716_4081	a_96_p102789	-3,2914	Unknown
BW686029	a_96_p038591	-2,1979	Up-9a
AK329079	a_96_p111557	2,6183	Upa19
AK326182	a_96_p063356	3,8568	Wd-40 Repeat Family Protein
BM411334	a_96_p148596	-2,5629	Yggf Family Protein

Tabella A.3: Elenco dei geni differenzialmente espressi (p-value <0,05 e fold-change 2) nelle piante di pomodoro cv. Microtom a 96h dall'infestazione con l'afide *M. euphorbiae*.

Processo biologico	N° Accesione	Probe	Fold change	descrizione
<b>Organizzazione cellulare</b>				
	AW979691	a_96_p170119	2,0358	transposase
	AI486498	a_96_p131097	2,0628	aaa-type atpase family protein
	AW738359	a_96_p094574	-2,4839	gigantea
	BM413010	a_96_p046181	-2,4181	gigantea
		a_96_p164531	-2,2660	gigantea
		a_96_p185159	-2,2463	gigantea
	TC200218	a_96_p094579	-2,2359	gigantea
	AK323048	a_96_p068071	-2,5254	SP5G
	TA51463_4081	a_96_p109727	2,3258	Protein ABIL1, putative
<b>Trascrizione</b>				
	TC193328	a_96_p249907	-2,2954	ap2/erf domain-containing transcription factor
	AJ277944	a_96_p012841	-5,0717	SANT/MYB domain protein
	AK322575	a_96_p166259	3,6202	WRKY transcription factor 6
	AK325041	a_96_p095769	31,7540	WRKY transcription factor 40
<b>Modificazione della parete cellulare</b>				
	GO375427	a_96_p188969	-2,1608	Extensin (Class I)
		a_96_p214729	-2,2510	
<b>Stress e risposte di difesa</b>				
	TC205122	a_96_p253872	4,0151	Acidic endochitinase III
	BG130936	a_96_p001606	2,9140	Acidic endochitinase III
	BG132609	a_96_p189179	3,2320	Acidic endochitinase III



	AK322555	a_96_p000486	2,3560	class II chitinase
		a_96_p077989	2,24407	
	Z68309	a_96_p081144	-3,3903	Metallothionein-like protein type 2
	AK328844	a_96_p118572	7,5182	NIMIN2c protein
	TC209201	a_96_p121232	-2,1298	oxidoreductase
	TC201573	a_96_p104449	-3,1936	acid phosphatase
<b>Trasduzione del segnale</b>				
	AK320116	a_96_p120827	2,0027	histidine phosphotransfer protein
<b>Fotosintesi</b>				
	TC216543	a_96_p262427	-2,3640	photosystem II protein i
	TC209578	a_96_p256177	-2,5304	Photosystem II reaction center protein K
<b>Metabolismo primario</b>				
	AK321493	a_96_p234814	2,0949	3-ketoacyl-CoA synthase 10
		a_96_p260552	2,2998	
	BT014282	a_96_p005351	-2,1567	omega-3 fatty acid desaturase
	AK320021	a_96_p042146	2,0840	lipid transfer-like protein
		a_96_p148481	2,1728	
	BE354280	a_96_p171376	2,6437	GDSL-lipase protein
	BE460155	a_96_p177944	2,2221	GDSL esterase/lipase
	TC207049	a_96_p125232	2,5538	GDSL esterase/lipase
<b>Metabolismo secondario</b>				
	Z18277	a_96_p012586	-2,5518	Dihydroflavonol-4-reductase
	TC207273	a_96_p089734	-2,1031	thiamin biosynthetic enzyme
<b>Transporto</b>				
	AK324623	a_96_p258072	3,2243	cationic amino acid transporter
<b>Funzione sconosciuta</b>				
	AK247464	a_96_p126832	2,0916	Putative uncharacterized protein
	AI773375	a_96_p032776	2,1818	Predicted protein
		a_96_p134312	2,9213	
	BG626289	a_96_p191499	-2,0738	Unknown protein
	AK247024	a_96_p094649	-2,1513	Putative uncharacterized protein
		a_96_p095544	-2,2191	
	AK247134	a_96_p115672	-2,5611	Putative uncharacterized protein
	BW685690	a_96_p067696	-2,5709	Putative uncharacterized protein
	BF113946	a_96_p183779	-3,8271	unnamed protein product

Tabella A.4: Elenco delle proteine differenzialmente espresse identificate mediante analisi MALDI-TOF/MS e LCMS/MS in seguito ad attacco dell'afide *M. euphorbiae*

Spot	Descrizione	Codice Expsy	Organismo	Metodo identificativo	peptidi/ Copertura%	Fold change Afidi/CTRL
<b>Fotosintesi e Metabolismo primario</b>						
41	Oxygen-evolving enhancer protein 1	P26320	S. tuberosum	PMF	7/34	off
35	Oxygen-evolving enhancer protein 1	P23322	S. lycopersicum	PMF	6/34	4,74
36	Oxygen-evolving enhancer protein 1	P23322	S. lycopersicum	PMF	10/47	4,41
37	Oxygen-evolving enhancer protein 1	P23322	S. lycopersicum	PMF	8/29	0,39
61	Oxygen-evolving enhancer protein 2	P29795	S. lycopersicum	PMF	10/44	4,25
62	Oxygen-evolving enhancer protein 2	P29795	S. lycopersicum	PMF	7/35	4,33

65	Oxygen-evolving enhancer protein 2	P29795	S. lycopersicum	PMF	8/39	0,08
78	Oxygen-evolving enhancer protein 2	P29795	S. lycopersicum	PMF	11/53	0,32
73	Oxygen-evolving complex protein 3	Q672Q6	S. lycopersicum	PMF	10/36	14,4
8	ATP synthase subunit beta 2	O82722	N. sylvestris	PMF	14/438	4,37
9	ATP synthase subunit beta	Q2MI93	S. lycopersicum	PMF	20/55	0,32
7	ATP synthase subunit beta	Q2MI93	S. lycopersicum	PMF	20/55	0,15
21	Rubisco activase	O49074	S. pennellii	PMF	17/33	off
17	Rubisco activase	O49074	S. pennellii	PMF	20/35	7,1
20	Rubisco activase	O49074	S. pennellii	PMF	10/20	0,34
59	Rubisco activase	O49074	S. pennellii	PMF	11/23	4,39
86	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 1	P08706	S. lycopersicum	PMF	5/23	off
44	Triosephosphate isomerase	Q38JI4	S. tuberosum	PMF	8/42	0,29
49	Triosephosphate isomerase	Q38JI4	S. tuberosum	PMF	9/45	0,5
53	Triosephosphate isomerase	P48496	S. oleracea	PMF	10/28	0,46
13	Serine hydroxymethyltransferase	P50433	S. tuberosum	PMF	13/20	2,59
11	Serine hydroxymethyltransferase	P50433	S. tuberosum	PMF	9/14	0,42
26	Aminomethyltransferase	P54260	S. tuberosum	PMF	10/20	0,2
27	Aminomethyltransferase	P54260	S. tuberosum	PMF	12/32	15
<b>Trasporto degli elettroni</b>						
31	Apocytochrome f	Q2MI87	S. lycopersicum	PMF	10/32	0,22
66	Ferredoxin-1, chloroplastic	Q43517	S. lycopersicum	LCMSMS	3/6	4,57
74	Ferredoxin-1, chloroplastic	Q43517	S. lycopersicum	LCMSMS	4/10	0,17
33	Mitochondrial outer membrane protein porin (VDAC)	P42055	S. tuberosum	PMF	9/35	30,3
85	Plastocyanin, chloroplastic	P17340	S. lycopersicum	LCMSMS	6/28	0,18
<b>Risposta agli stress ossidativi</b>						
64	Thioredoxin peroxidase 1	Q7Y240	S. lycopersicum	PMF	6/29	0,19
23	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	B9SHB0	R. communis	PMF	9/26	0,19
<b>Stress e risposte di difesa</b>						
1	Chloroplast heat shock protein 70	B1A010	Ipomoea nil	PMF	8/14	0,45
2	Chloroplast heat shock protein 70	B1A010	Ipomoea nil	PMF	10/17	0,26
79	Nucleoside diphosphate kinase 1	P47921	S. lycopersicum	PMF	7/38	0,49
77	Glycine-rich RNA-binding protein	Q03879	D. carota	PMF	8/43	0,33
25	Putative RNA-binding protein	B9RFM2	R. communis	PMF	10/34	0,27
56	Putative RNA-binding protein	Q8L941	A. thaliana	PMF	7/29	0,35
58	RNA recognition motif (RRM)	Q2A977	B. oleracea	PMF	5/25	0,48
55	Probable plastid-lipid-associated protein 6	Q9LW57	A. thaliana	PMF	7/33	0,23
<b>Metabolism proteico</b>						
14	Elongation factor TuB	Q43364	N. sylvestris	PMF	7/18	0,17
51	Chaperonin 21	Q9M5A8	S. lycopersicum	PMF	7/28	2,26
87	Chloroplast chaperonin 10	O80504	A. thaliana	LCMSMS	14/45	0,14
28	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	B9SW20	R. communis	PMF	6/23	0,27
15	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	B9RUU4	R. communis	PMF	9/32	0,26
43	Proteasome subunit alpha type-6	Q9XG77	N. tabacum	PMF	9/34	0,24
3	FtsH-like protein Pftf	O99018	N. tabacum	PMF	9/19	0,3
38	Chloroplast-specific ribosomal protein	Q672Q2	S. lycopersicum	PMF	7/24	0,33
19	DegP protease_serine-type peptidase	O22609	A. thaliana	PMF	14/27	0,5
40	Protein binding protein, putative	B9SBN8	R. communis	PMF	17/50	0,24

**Periodo di soggiorno estero:**

Stage di 5 mesi (da aprile 2011 a settembre 2011) presso il laboratorio della Dott.ssa Roxina Soler, University of Wageningen e il laboratorio del Dott. Martijn Bezemer, Terrestrial Ecology Departement, The Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Olanda.

Durante questo periodo è stato condotto uno studio della risposta del pomodoro in una interazione con due insetti dannosi, afidi e erbivori della radice, mediante la valutazione della difesa diretta ed indiretta e un'analisi trascrizionale.

## **Pubblicazioni su riviste indicizzate ISI :**

V. Coppola, 2010. Study of Molecular Bases of Plant-Aphid Interaction. *Minerva Biotechnologica*, 22, Suppl. 1, No 2, 23-24

M.C. Digilio, G. Corrado, R. Sasso, V. Coppola, L. Iodice, M. Pasquariello, S. Bossi, M.E. Maffei, M. Coppola, F. Pennacchio, R. Rao, E. Guerrieri, 2010. Molecular and chemical mechanisms involved in aphid resistance in cultivated tomato. *New Phytologist* 187: 1089–1101

## **Abstract:**

V. Coppola, G. Corrado, M.C. Digilio, M. Pasquariello & R. Rao, 2009. Cambiamenti trascrizionali di geni di difesa in risposta ad afidi in genotipi di pomodoro suscettibili e resistenti. *Proceedings of XXII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Ancona, Italia – 15/18 Giugno, 2009* VIII-275

Coppola V., Corrado G., Buonomo T., Digilio M.C., Renzone G., D'ambrosio C., Scaloni A., Rocco M, Martinelli R., Rao R., 2010. Study of Molecular Bases of Plant-Aphid Interaction. *Proceedings of the 54th Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress Matera, Italy – 27/30 September, 2010* ISBN 978-88-904570-0-5

Coppola V., Corrado G., Buonomo T., Digilio MC., Renzone G., D'Ambrosio C., Scaloni A., Rocco M., Martinelli R., Rao R, 2010. Studio delle basi molecolari dell'interazione pianta-afide. *Proceedings of Giornate Scientifiche 2010-Polo delle Scienze e Tecnologie per la vita, Napoli, Italia - 25-26 novembre, 2010* II-243

V. Coppola, T. Buonomo, M.C. Digilio, R. Martinelli, G. Corrado, R. Rao, 2011. A time series-based study of transcriptional changes of tomato plants induced by potato aphid (*M. euphorbiae*) attack. *Proceedings of 2<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European PhD Network in "Insect Sciences", Tours, France- 7/11 November, 2011* 4-60

# Molecular and chemical mechanisms involved in aphid resistance in cultivated tomato

Maria Cristina Digilio<sup>1\*</sup>, Giandomenico Corrado<sup>2\*</sup>, Raffaele Sasso<sup>3</sup>, Valentina Coppola<sup>2</sup>, Luigi Iodice<sup>3</sup>, Marianna Pasquariello<sup>2</sup>, Simone Bossi<sup>4</sup>, Massimo E. Maffei<sup>4</sup>, Mariangela Coppola<sup>2</sup>, Francesco Pennacchio<sup>1</sup>, Rosa Rao<sup>2</sup> and Emilio Guerrieri<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Entomologia e Zoologia agraria 'Filippo Silvestri', Università di Napoli 'Federico II', Via Università 100, 80055 Portici (NA), Italy;

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta e dell'Ambiente, Università di Napoli 'Federico II', Via Università 100, 80055 Portici (NA), Italy; <sup>3</sup>Istituto per la Protezione delle Piante, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Università 133, 80055 Portici (NA), Italy; <sup>4</sup>Dipartimento di Biologia Vegetale, Unità di Fisiologia Vegetale, Università di Torino – Centro della Innovazione, Via Quarello 11/A, 10135 Torino, Italy

## Summary

Authors for correspondence:

Emilio Guerrieri

Tel: +39 081 7753658 ext 11

Email: guerrieri@ipp.cnr.it

Rosa Rao

Tel: +39 081 2539204

Email: rao@unina.it

Received: 11 March 2010

Accepted: 26 April 2010

New Phytologist (2010)

doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03314.x

**Key words:** *Aphidius ervi*, aphid parasitoid, gene expression, *Macrosiphum euphorbiae*, *Solanum lycopersicum*, volatile organic compounds.

- An integrated approach has been used to obtain an understanding of the molecular and chemical mechanisms underlying resistance to aphids in cherry-like tomato (*Solanum lycopersicum*) landraces from the Campania region (southern Italy). The aphid–parasitoid system *Macrosiphum euphorbiae*–*Aphidius ervi* was used to describe the levels of resistance against aphids in two tomato accessions (AN5, AN7) exhibiting high yield and quality traits and lacking the tomato *Mi* gene.
- Aphid development and reproduction, flight response by the aphid parasitoid *A. ervi*, gas chromatography–mass spectrometry headspace analysis of plant volatile organic compounds and transcriptional analysis of aphid responsive genes were performed on selected tomato accessions and on a susceptible commercial variety (M82).
- When compared with the cultivated variety, M82, AN5 and AN7 showed a significant reduction of *M. euphorbiae* fitness, the release of larger amounts of specific volatile organic compounds that are attractive to the aphid parasitoid *A. ervi*, a constitutively higher level of expression of plant defence genes and differential enhancement of plant indirect resistance induced by aphid feeding.
- These results provide new insights on how local selection can offer the possibility of the development of innovative genetic strategies to increase tomato resistance against aphids.

## Introduction

The molecular and chemical mechanisms regulating plant resistance to insects have been studied extensively in a number of systems. The continuously increasing information in this field offers new tools and opportunities for the development of sustainable pest control technologies in agriculture. Two main categories of plant defence mechanism against insects have been proposed. The first, referred to as direct resistance, involves morphological (e.g. thorns, trichomes) and chemical (e.g. antibiotics) features which

hamper directly the colonization of the plant by the invading insect. The second, referred to as indirect resistance, involves the production of extra floral nectar (Wäckers & Bonifay, 2004) or the release of volatile organic compounds (VOCs) by the infested plant which become attractive for the natural enemies of insect pests (Agrawal *et al.*, 1999).

A remarkable background of basic information has been produced on tomato–pest–natural enemy interactions which is unique for crop plants (Kennedy, 2003). The potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae), and other aphid species may cause severe losses to tomato plants by their feeding activity and by the transmission of

\*These authors contributed equally to this work.

phytopathogenic viruses (Lange & Bronson, 1981; Walgenbrach, 1997). The control of aphids is largely achieved by insecticides, and the possible use of more sustainable control measures is highly desirable. Among these, strategies based on insect-resistant germplasm and biological control agents appear to be particularly promising (Guerrieri & Digilio, 2008).

The mechanisms of direct resistance to aphids in tomato plants have been investigated extensively. Indeed, the most studied resistance gene to animal pests is *Mi 1.2*, isolated from *Solanum habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner, which confers resistance to the aphid *M. euphorbiae*, to the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius), to the tomato psyllid *Bactericerca cockerelli* (Sulc) and to three species of nematode, including *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) (Kaloshian *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 1998; Vos *et al.*, 1998; Nombela *et al.*, 2003; Casteel *et al.*, 2006). The *Mi* locus has been transferred to several cultivated varieties, but the level of resistance of *Mi* varieties seems to be limited to some biotypes of *M. euphorbiae* (Goggin *et al.*, 2001), and varies with plant age (Hebert *et al.*, 2007). The *Mi* mechanism is a typical gene-for-gene interaction, mediated by recognition processes of aphid-derived elicitors by plant resistance effectors. In this case, a plant resistant to aphids is characterized by the presence of a single resistance (*R*) gene, which is usually inherited as a dominant trait (Smith & Boyko, 2007).

The mechanisms regulating tomato attractiveness towards natural enemies of aphids have been investigated in recent years (Corrado *et al.*, 2007; Sasso *et al.*, 2007, 2009). The main compounds eliciting a flight response by the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae), the most effective natural enemy of *M. euphorbiae*, have been identified by combining behavioural observations, tomato VOC analysis and parasitoid antennal response (Sasso *et al.*, 2007, 2009). In the multifaceted plant response, the greater production of methyl salicylate and terpenes in response to aphid infestation (Sasso *et al.*, 2007) implies the activation of the salicylic acid (SA) and octadecanoid (jasmonic acid, JA) pathways, and indicates the possible occurrence of complex cross-talking interactions between these metabolic pathways, which are mainly involved in the response against pathogens and pests, respectively.

In this study, we analyse both the direct and indirect defence mechanisms induced by aphids in tomato plants by performing a biological, behavioural, chemical and genetic characterization of resistant genotypes, selected among landraces and locally adapted accessions. Using the tri-trophic system tomato (*Solanum lycopersicum*)–*M. euphorbiae*–*A. ervi*, we show that aphid resistance (direct and indirect) in these genotypes is associated with a constitutively higher level of expression of defence genes that respond to aphids. The gathered data may allow a more

effective manipulation and exploitation of genetic traits of tomato resistance against aphids.

## Materials and Methods

### Plants and insects

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes used were the cultivated variety M82 (susceptible to aphids) and two accessions (named here AN5 and AN7) cultivated in a geographical area of the Campania region of Italy, Agro Nocerino-Sarnese, where aphid-borne viral diseases are one of the most serious problems. These two accessions belong to a collection of Corbarino cherry-like tomato landraces, partially characterized by Giordano *et al.* (2000), and were selected in this study for their field performances in terms of insect and virus resistance (Andreakis *et al.*, 2004). For the genotypic characterization of plant material, we also analysed a common cultivar resistant to Verticillium wilt, Fusarium wilt and nematodes (VFN) that contains the *Mi* gene (Roma).

*Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) has been continuously reared on tomato, since 1998, in an environmental chamber at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $65 \pm 5\%$  relative humidity, 18 h light (L) : 6 h dark (D) photoperiod, starting from a colony collected on tomato plants in Scafati (Salerno, Italy).

*Aphidius ervi* Haliday was continuously reared in an environmental chamber at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , 18 h L : 6 h D photoperiod and  $60 \pm 5\%$  relative humidity, on its natural host, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris), maintained on potted broad bean plants (*Vicia faba* L., cv Aquadulce), as described previously (Guerrieri *et al.*, 2002). Parasitoids for flight behaviour bioassays were reared as synchronized cohorts, which were standardized as reported previously (Guerrieri *et al.*, 2002). In brief, broad bean plants infested with *A. pisum* were exposed for 24 h to mated females of *A. ervi*. The resulting mummies were isolated and, at their emergence, adult parasitoids were sexed and placed in a box with honey at a sex ratio of 1 : 1. Female parasitoids were used for wind tunnel bioassay between 24 and 48 h after their emergence, and had no prior contact with tomato plants and/or *M. euphorbiae* (naive).

### Direct resistance against aphids

Five weeks after sowing, 40 plants for each genotype were infested with a newly born first instar nymph of *M. euphorbiae*. Assays were carried out at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $65 \pm 5\%$  relative humidity, 18 h L : 6 h D photoperiod. The presence of aphid, presence of exuviae (i.e. occurrence of moulting) and the number of newly laid nymphs (i.e. beginning of reproduction) were monitored daily. Constitutive direct resistance against aphids was evaluated by calculating the maximum intrinsic rate of population

increase ( $r_m$ ) for each genotype by an iterative solution of the approximation of the Euler equation,

$$r_m = \log_e R_0 / T$$

(Birch, 1948), where

$$R_0 = \sum l_x m_x$$

$$T = \sum x l_x m_x / l_x m_x$$

with  $l_x$  and  $m_x$  representing the age-specific adult survival and the reproduction rates of female offspring at age  $x$  (expressed in days), respectively, assigned by taking the mean development time in days + 0.5 as the starting point. The accurate value of  $r_m$  was then calculated by solving the equation

$$\sum e^{-r_m x} l_x m_x = 1$$

Longevity and progeny data were compared by one-way ANOVA, and the mean values were compared by Fisher's least significant difference (LSD) test. The numbers of reproducing aphids were compared by  $\chi^2$  test.

### Induced plant response to aphid feeding

To obtain information on the induction of the defence response following aphid feeding, tomato plants were infested with *M. euphorbiae* and leaves were collected after 7 d, after removing the experimental aphids. Approximately 200 mixed instars of potato aphids were gently transferred onto AN5, AN7 and M82 plants, at the five- to six-leaf stage, in order to obtain complete coverage of the lower side of the leaves. This infestation load was restored every other day by adding new aphids to infested plants, as required. Rearing conditions were as already described. Control, uninfested plants were grown under the same conditions. This infestation protocol was adopted to produce the plant material for the assessment of the aphid-induced plant response, both in terms of attractiveness towards parasitoids and of the expression pattern of defence genes.

### Flight behaviour bioassay

Constitutive and induced indirect resistances to *M. euphorbiae* were measured as the relative attractiveness towards the parasitoid *A. ervi* in a wind tunnel bioassay (Guerrieri *et al.*, 2002). For each genotype, the constitutive attractiveness was measured by testing 10 uninfested plants, 4 wk old, over 10 consecutive days. The same plants were then infested with *M. euphorbiae* for 1 wk, as already

described, and tested again in a wind tunnel bioassay to assess the attractiveness towards *A. ervi* after aphid feeding induction. The parameters of the bioassay were set as follows: temperature,  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ; relative humidity,  $65 \pm 5\%$ ; wind speed,  $25 \pm 5 \text{ cm s}^{-1}$ ; distance between releasing vial and target, 50 cm; light intensity at releasing point, 3600 lx. For each experimental combination, 10 plants were used. One hundred and fifty parasitoid females were tested singly for each target in no-choice experiments, and flight behaviour data were recorded and analysed with the aid of event-recording software (the Observer; Noldus Information Technology, Wageningen, the Netherlands).

The percentage of response (oriented flights, landings on the target) to each target was calculated. The number of parasitoids responding to each target in any experiment was compared by a  $G$  test for independence, with William's correction (Sokal & Rohlf, 1981). The resulting values of  $G$  were compared with the critical values of  $\chi^2$  (Rohlf & Sokal, 1995).

### Headspace volatile collection and analyses

Volatiles from 10 uninfested plants per genotype were collected for 24 h by an air-tight entrainment system, using an adsorbent trap made of Tenax TA 60/80 (Sasso *et al.*, 2007), soon after plants had been tested in the wind tunnel bioassay. Known amounts of standard molecules (see later) were used to calculate the recovery of the adsorption/desorption method and for calibration. The traps were desorbed by pipetting 2 ml of redistilled hexane. The eluted extract was concentrated under a nitrogen flux to a volume of 500  $\mu\text{l}$ . The concentrated extracts and standard solutions were injected (3  $\mu\text{l}$  volume) in the split/splitless injection port (injector) of a 6890N gas chromatograph (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), coupled with an EI-quadrupole 5973 mass spectrometer (Agilent Technologies). Chromatographic separation was carried out with a ZB-5MS column (Zebron Phenomenex, Inc., Torrance, CA, USA). The experimental conditions were as follows: injector,  $260^\circ\text{C}$ ; transfer line to Mass Spectrometer Detector (MSD),  $280^\circ\text{C}$ ; oven temperature: start,  $60^\circ\text{C}$ ; hold, 5 min; programmed from  $60^\circ\text{C}$  to  $87^\circ\text{C}$  at  $1^\circ\text{C min}^{-1}$ ; a second temperature ramp was programmed from  $87^\circ\text{C}$  to  $150^\circ\text{C}$  at  $5^\circ\text{C min}^{-1}$ ; a third temperature ramp was programmed from  $150^\circ\text{C}$  to  $300^\circ\text{C}$  at  $20^\circ\text{C min}^{-1}$ ; hold, 2 min; flow rate of carrier gas (helium),  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Mass spectral data acquisition was performed in SIM mode and in SCAN mode. The SIM mode parameters set for the mass filter (quadrupole) were organized for each run in four groups of specified masses, according to the retention times and spectra previously found in test runs using standard molecules: first group, 77  $m/z$  and 99  $m/z$ ; second group, 79  $m/z$ , 91  $m/z$  and 93  $m/z$ ; third group, 119  $m/z$ , 92  $m/z$  and 120  $m/z$ ; fourth group, 91  $m/z$ ,



93 *m/z*, 133 *m/z* and 161 *m/z*. The SCAN mode parameters were 50 *m/z* as the lower mass and 220 *m/z* as the higher mass. Both acquisition settings were carried out with an ionization energy of 70 eV. Volatile compounds were identified by comparison of their mass spectra and retention indices (Kováts indices) with those of reference substances, where possible, and by comparison with the National Institute of Standards and Technology (NIST) mass spectral search software v 2.0, using the libraries NIST 98 and Adams (2001). The mean area of each identified peak and the total emission of volatiles were analysed by one-way *t*-paired test (Genstat 11th, VSN International Ltd Hemel Hempstead UK).

The following commercial standards were used for the identification of volatiles collected by air entrainment of the headspace from tomato plants, and were for gas chromatography unless specified (purity level in parentheses): anisole-*p*-allyl ( $\geq 98.5\%$ ), camphor ( $\geq 95\%$ ),  $\delta$ -2-carene ( $\geq 96\%$ ), (*E*)- $\beta$ -caryophyllene ( $\geq 98.5\%$ ), chlorobenzene ( $\geq 99\%$ ),  $\alpha$ -copaene ( $\geq 90\%$ ), *p*-cymene ( $\geq 99.5\%$ ), decane ( $\geq 99.8\%$ ), *p*-dichlorobenzene ( $\geq 98\%$ ), dodecene ( $\geq 99\%$ ), 1,8-cineol ( $\geq 99\%$ ), eugenol ( $\geq 99\%$ ), (*E*)- $\beta$ -farnesene ( $\geq 90\%$ ),  $\alpha$ -gurjunene ( $\geq 97\%$ ), hexanal ( $\geq 97\%$ ), (*Z*)-3-hexen-1-ol ( $\geq 98\%$ ), humulene (=  $\alpha$ -caryophyllene) ( $\geq 98\%$ ), (*Z*)-jasmone ( $\geq 99\%$ ), (*E*)-jasmone, (*R*)-(+)-limonene, (*S*)-(–)-limonene, linalool, (+)-longifolene, menthol, 6-methyl-5-hepten-2-one, methyl salicylate,  $\beta$ -myrcene, (*Z*)-nerolidol, ocimene, (*R*)-(–)- $\alpha$ -phellandrene,  $\alpha$ -pinene, skatol,  $\alpha$ -terpinene,  $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -terpineol, iso-terpinolene.

### Isolation of genomic DNA from plants and molecular fingerprint

Leaves (0.5–2 g) were ground in liquid nitrogen and resuspended in 15 ml of extraction buffer (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.05 M EDTA, 0.5 M NaCl, 0.01 M  $\beta$ -mercaptoethanol). Membranes were lysed by adding 2 ml of 10% w/v SDS and incubating at 65°C for 20 min. After the addition of 5 ml of 5 M potassium acetate and incubation on ice for 15 min, the extract was centrifuged at 20 800 *g* for 15 min at 4°C. The supernatant was added with 0.6 vol of isopropanol and the pellet of nucleic acids

was resuspended in 400  $\mu$ l of TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA), and incubated with 10  $\mu$ l of 10 mg ml<sup>–1</sup> RNase A at 37°C for 30 min. The solution was then transferred into a 2 ml Eppendorf tube, incubated with 400  $\mu$ l cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) buffer at 65°C for 15 min, and a subsequent extraction with 1 vol of chloroform was performed. After centrifugation for 10 min at 20 800 *g* at 4°C, the aqueous phase was transferred to a new tube, the DNA was precipitated by the addition of 1 vol of isopropanol and centrifuged at 20 800 *g* (4°C) for 10 min. The pellet was washed with 70% ethanol, centrifuged at 20 800 *g* (4°C) for 5 min, air-dried and resuspended in 100  $\mu$ l TE buffer. The DNA fingerprint with the (GATA)<sub>4</sub> oligonucleotide was performed as described previously (Rao *et al.*, 2006). For the analysis of cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) of resistance genes, DNA was amplified using the following conditions: reaction volume of 50  $\mu$ l containing 1  $\times$  Taq polymerase buffer (Promega), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.2–0.4  $\mu$ M of each of the two oligonucleotide primers, 1 u Taq Polymerase (Promega) and 100 ng of genomic DNA. PCRs started with an initial denaturation step at 94°C for 4 min, followed by 30 cycles of amplification that included a denaturation step of 1 min at 94°C, an annealing time of 45 s, at the temperatures indicated in Supporting Information Tables S1 and S2, and an extension period of 60 s kb<sup>–1</sup> of amplified target at 72°C. A final step of 9 min at 72°C concluded the PCRs. Cycles were performed using a Mastercycler Gradient PCR machine (Eppendorf, Milan, Italy). Amplicons were cleaved using restriction endonucleases according to the manufacturer's recommendations (Promega), employing a three-fold excess of enzyme in a final volume reaction of 100  $\mu$ l. The enzymes and primers employed and the expected fragments are indicated in Supporting Information Table S1.

### Isolation of RNA from plants and cDNA synthesis

To analyse gene expression in plant material standardized as for VOC analysis, total RNA was isolated from 4-wk-old uninfested plants and from plants infested for 7 d with

	M82	AN5	AN7
Longevity (d) (mean $\pm$ SD)	16.65 $\pm$ 5.64 a	11.08 $\pm$ 3.94 b	14.43 $\pm$ 2.93 c
Fertile aphids (%)	73.08 a	5.00 b	20.00 c
Progeny, ♀♀/♀ (mean $\pm$ SD)	13.58 $\pm$ 15.56 a	0.18 $\pm$ 0.96 b	0.98 $\pm$ 2.42 b
<i>r</i> <sub>m</sub>	+0.39	–0.09	+0.05
$\lambda$	1.48	0.91	1.05

Longevity and progeny data were compared by one-way ANOVA (*F*-value = 16.873 and 27.238, respectively, *n* = 40, *P* < 0.01), and mean values were compared by Fisher's least significant difference (LSD) test; longevity, *t* = 1.79, *P* < 0.01; progeny, *t* = 3.77, *P* < 0.01. The number of fertile aphids was compared by  $\chi^2$  test. For both types of test, statistically significantly different values (*P* < 0.01) are denoted with different letters.

**Table 1** Demographic analysis of *Macrosiphum euphorbiae* on the tomato genotypes M82, AN5 and AN7 (*r*<sub>m</sub>, maximum rate of increase;  $\lambda$ , finite rate of increase)



**Table 2** Relative amounts of the 14 volatile compounds identified in tomato susceptible variety M82 and in the resistant genotypes AN5 and AN7

	Kováts index	M82	AN5	AN7
(Z)-3-Hexen-1-ol	859	5141 ± 0.448	5645 ± 1.418	5633 ± 1.434
α-Pinene	939	80 102 ± 16.143	154 148* ± 61.134	177 975* ± 57.941
Myrcene	991	27 000 ± 9.983	56 792** ± 7.774	1541** ± 0.843
δ-2-Carene	1002	8255 ± 4.183	13 424 ± 4.302	583 458** ± 480.060
α-Phellandrene	1003	58 307 ± 24.658	38 915 ± 12.076	89 534 ± 55.488
p-Cymene	1025	13 788 ± 9.629	105 031** ± 30.502	34 621 ± 13.226
Limonene	1029	129 484 ± 27.150	22 703 931** ± 11 411.537	2 354 701* ± 1317.174
(Z)-Ocimene	1037	6330 ± 3.836	6718 ± 3.160	4715 ± 1.287
γ-Terpinene	1060	33 166 ± 13.025	33 604 ± 15.703	30 680 ± 20.850
Iso-terpinolene	1089	60 902 ± 64.017	1 236 445** ± 137.059	411 059** ± 145.540
Methyl salicylate	1192	13 005 ± 0.258	20 882* ± 2.900	11 564 ± 1.533
(Z)-Jasmone	1393	23 800 ± 10.711	41 042** ± 18.114	21 077 ± 5.117
Longifolene	1408	27 378 ± 1.704	62 287** ± 20.117	36 331 ± 7.286
(E)-β-Caryophyllene	1419	1 410 835 ± 135.211	3 593 807** ± 1361.842	1 676 884 ± 313.327

Values, expressed in nanograms, are the mean ± SD.

For each compound, significant differences between the mean values observed for each accession and that of M82 are denoted with asterisks (\*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.01$ ).

hundreds of *M. euphorbiae*, as described previously. Aphids were removed manually from infested plants, and the leaves of the third branch were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. Approximately 0.5 g of leaf tissue was ground in liquid nitrogen and total RNA was isolated according to already published procedures (Corrado *et al.*, 2008). Ten micrograms of total RNA were treated with 7.5 u of RNase-free DNase I (Pharmacia, Milan, Italy) and first-strand cDNA synthesis was carried out as described previously (Corrado *et al.*, 2005). The PCR amplification of the cDNA coding for the *Elongation Factor 1-α* (*EF1-α*) gene, a ubiquitously expressed gene, served as a control for cDNA synthesis and PCR efficiency in the different samples. The sequences annealed by the two primers (EF fw and EF rv; Table S2) are localized in exons I and II of the *EF1-α* gene, respectively, for the detection of possible contaminant DNA in the PCR amplifications (Corrado *et al.*, 2007).

### Real-time PCR

Real-time PCRs were performed using the ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Milan, Italy). Reactions (total volume, 25 µl) were prepared with 12.5 µl of the 2 × SYBR Green PCR Master Kit (Applied Biosystems), 0.3 pmol of a primer pair and 0.2 µl of cDNA template. For each target, reactions were performed in triplicate and experiments were carried out on three replicates per genotype. The thermal cycling programme started with steps of 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of a 15 s step at 95°C, followed by 1 min at  $T_a$  indicated in Table S1. To check the

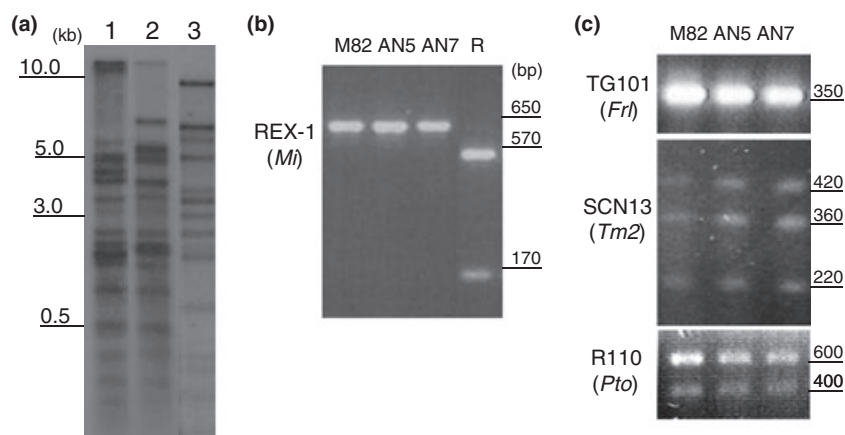
specificity of the amplification products, a dissociation kinetics analysis was performed after each assay. The reaction products were also resolved onto an agarose gel to verify amplicon size. The primer pairs used and the size of the expected amplicons are shown in Table S2.

Quantification of gene expression was carried out using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method (Livak & Schmittgen, 2001). We used the housekeeping *EF1-α* gene as an endogenous reference gene (Nicot *et al.*, 2005) for the normalization of the expression levels of the target genes. The statistical significance of the results was performed by evaluating whether the average  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  values of the resistant accession were significantly different from those of the calibrator genotype (Student's *t*-test).

## Results

### Genotypic characterization

Tomato accessions that are locally cultivated can be characterized by the presence of intravarietal genetic variability (Ruiz *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2006). Therefore, six plants of the accessions AN5 and AN7 were fingerprinted using a highly polymorphic DNA marker (Vosman *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 2006; Caramante *et al.*, 2009). The analysis with the (GATA)<sub>4</sub> oligonucleotide indicated that the two local accessions were genetically uniform and different, as all plants analysed generated different patterns fully consistent within each genotype (Fig. 1a). Furthermore, we wanted to exclude the presence of a few well-known resistance genes, frequently present in cultivated varieties, which could directly or indirectly influence plant performance in the



**Fig. 1** Genetic analysis of the tomato accessions AN5 and AN7. (a)  $(GATA)_4$  fingerprint of the AN5 (1) and AN7 (2) accessions and of a *Macrosiphum euphorbiae*-resistant VFN (resistant to Verticillium wilt, Fusarium wilt and nematodes) tomato variety (Roma) (3). (b) Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) analysis of the REX-1 marker, tightly associated with the *Mi* aphid resistance gene. A digestion control of a VFN variety, Roma (R), is shown for the REX-1 marker as, in this case, the susceptible allele is not digested by the *Taq* I enzyme. (c) CAPS analysis of genes that confer resistance to biotic stress. The three panels show the digestion profile of the markers (indicated in capital letters on the left) associated with resistance genes (in parentheses) that were selected as very common in commercial tomato cultivars.

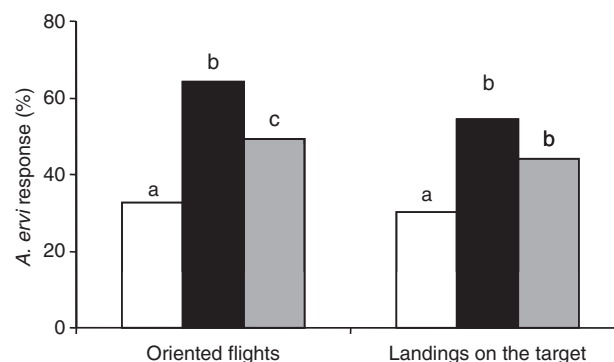
bioassays. This analysis was also essential to select an appropriate susceptible control, because many commercial varieties have introgressed major resistance genes. We analysed four CAPS markers, tightly linked to genes conferring resistance to aphids and other biotic stresses. The markers were REX-1, linked to the *Mi* 1.2 gene (Williamson *et al.*, 1994), TG101, linked to the *Frl* gene, which confers resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder and H.N. Hans (Fazio *et al.*, 1999), SCN13, linked to the *tm-2* gene (resistance to tobacco mosaic virus) (Sobir *et al.*, 2000), and R110, linked to the *Pto* gene, involved in the resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Young dye and Wilkie) (Martin *et al.*, 1991) and to other bacterial and fungal plant pathogens (Mysore *et al.*, 2003). The CAPS assay did not show any polymorphism in the analysed samples (Fig. 1b,c), indicating that the resistance alleles of the analysed genes are absent in the AN5 and AN7 accessions, as well as in the control cultivar M82.

#### Constitutive direct and indirect resistance to *M. euphorbiae*

The biological performance of aphids on the three genotypes is reported in Table 1. As indicated by the  $r_m$  values, M82 control plants were susceptible, allowing the experimental aphids to survive and reproduce much better than on the two germplasm accessions considered. Conversely, both the AN5 and AN7 genotypes displayed a significant level of resistance, with aphids showing impaired growth, which frequently prevented them from reaching the critical size for moulting. On AN5, the aphid population disappeared in  $11 \pm 3.9$  d (mean  $\pm$  SD), and only 5% of the experimental aphids underwent reproduction. This resulted in a negative value for the intrinsic rate of increase

( $r_m = -0.09$ ), and a finite rate of increase ( $\lambda$ ) below unity, which is the value registered in the case of a stable population (Table 1). A positive value of the intrinsic rate of increase was recorded on AN7, although it was close to zero ( $r_m = 0.05$ ), owing to poor reproduction, with only  $0.98 \pm 2.4$  nymphs (mean  $\pm$  SD) per aphid. On this genotype,  $\lambda$  was 1.05, indicating the presence of a very small increase in the aphid population in the ideal conditions of the assay (best climatic conditions and absence of intra- and interspecific competition).

The results of the wind tunnel bioassay with uninfested plants are reported in Fig. 2. Both AN5 and AN7 showed a significantly higher level of constitutive attractiveness towards *A. ervi* with respect to M82 (oriented flights, 32.6%). The uninfested AN5 showed the strongest response



**Fig. 2** Percentage of response (oriented flights, landings on the target) of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* towards uninfested plants of the tomato genotypes M82 (white columns), AN5 (black columns) and AN7 (grey columns). Mean values within each response denoted with different letters are significantly different ( $P < 0.01$ ).

(64.29%), which was significantly higher ( $P \leq 0.01$ ) than that registered for AN7 (49.35%). The percentages of landings on the target showed the same pattern (Fig. 2), as a similar and very high percentage of oriented flights resulted in a landing on the target for all three genotypes (93.1% in M82, 84.4% in AN5 and 89.5% in AN7).

### Headspace VOC analyses

Of the selected standards (see previously), only 14 compounds were detected in the collected VOCs, and, in many cases, significant quantitative differences were observed between genotypes (Table 2). Compared with the M82 control, the AN5 genotype released significantly greater amounts of the following compounds:  $\alpha$ -pinene, myrcene, *p*-cymene, limonene, iso-terpinolene, methyl salicylate, (*Z*)-jasmane, longifolene and (*E*)- $\beta$ -caryophyllene. AN7 emissions were significantly higher than those of M82 for  $\alpha$ -pinene, myrcene, limonene and iso-terpinolene. Only for one compound ( $\delta$ -2-carene) was the emission of genotype AN7 significantly higher than that of the other two genotypes. The relative proportion of identified compounds, within each genotype considered, and the relative ratio for each compound between the two accessions and the susceptible cultivated variety M82 are reported in Table 3. AN5 releases quantities of limonene and iso-terpinolene 175-fold and 20-fold higher, respectively, than M82, whereas, in AN7, these higher release rates decrease to 18-fold and seven-fold, respectively. Moreover,  $\delta$ -2-carene is released by AN7 in quantities 70-fold higher than by M82.

The AN5 genotype released a substantially greater amount of the identified volatiles (sum of the average area peak of each identified compound, 28 223 432.5), followed by AN7 (3 821 604.6) and M82 (703 255.9), and this pattern is consistent with the results of the constitutive attractiveness towards parasitoids of uninfested plants.

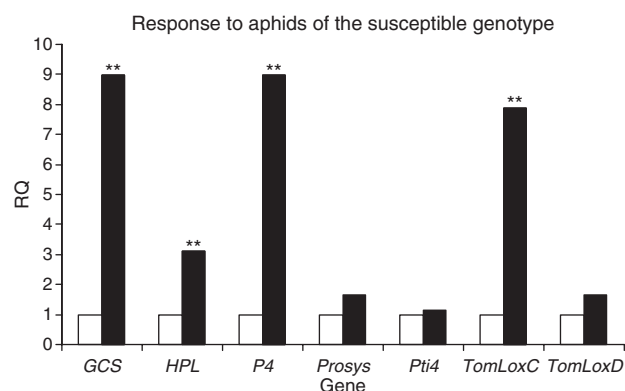
### Constitutive expression of the aphid-induced genes is higher in resistant genotypes

The changes in plant gene expression induced by aphids and, in general, by phloem-feeding insects are complex and involve different signalling pathways (Thompson & Goggin, 2006; Girling *et al.*, 2008). Our first aim was to identify the genes belonging to different plant response pathways, which are activated by aphid feeding in tomato. This analysis was carried out on the susceptible cultivar M82, 7 d post-infestation, and the results are shown in Fig. 3. Among the genes of the octadecanoid pathway analysed, only one (*LoxC*) of the two plastidial tomato Lox isoforms that participate in the synthesis of JA, and the hydroperoxide lyase gene (*HPL*), producing stress-inducible compounds such as Green Leaf Volatile (GLV), were over-expressed. HPL-derived metabolites are also strictly linked to direct resistance against aphids in potato (Vancanneyt *et al.*, 2001). A significant induction of expression was also observed for the germacrene C synthase (*GCS*) gene, which encodes for proteins involved in the biosynthesis of terpenoids (a major class of VOC in plants), and for the *P4* gene, coding a pathogenesis-related (PR) protein, with unknown functions, that is induced by aphids and SA. However, differences were not observed for another pathogen-inducible gene, *Pti4*, which encodes an ethylene-responsive transcription factor which is important for the activation of GCC-box *PR* genes in tomato (Chakravarthy *et al.*, 2003). The specificity of the plant response to aphids was also indicated by the lack of activation of the prosystemin gene, a primary signal for the systemic transmission of the defence signal induced by herbivore chewers in tomato plants. These data suggest that mechanical damage plays little role in the elicitation of plant response when aphids have established their feeding site.

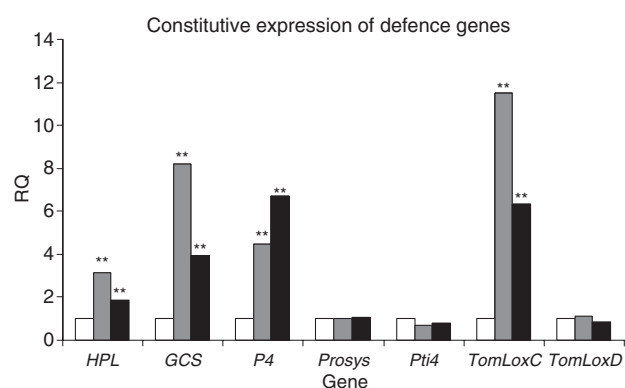
Subsequently, we compared the constitutive expression level in the resistant and susceptible genotypes. As shown in

**Table 3** Relative proportion of identified compounds within each tomato genotype, and between the accessions AN5 and AN7 with respect to the cultivated variety M82

	Relative proportion M82	Relative proportion AN5	Relative proportion AN7	Relative proportion AN5/M82	Relative proportion AN7/M82
( <i>Z</i> )-3-Hexen-1-ol	0.0027	0.0002	0.0010	1.0982	1.0957
$\alpha$ -Pinene	0.0422	0.0055	0.0327	1.9244	2.2218
Myrcene	0.0142	0.0020	0.0003	2.1034	0.0571
$\delta$ -2-Carene	0.0044	0.0005	0.1073	1.6262	70.6814
$\alpha$ -Phellandrene	0.0307	0.0014	0.0165	0.6674	1.5356
<i>p</i> -Cymene	0.0073	0.0037	0.0064	7.6178	2.5110
Limonene	0.0682	0.8088	0.4329	175.3418	18.1853
( <i>Z</i> )-Ocimene	0.0033	0.0002	0.0009	1.0613	0.7449
$\gamma$ -Terpinene	0.0175	0.0012	0.0056	1.0132	0.9250
Iso-terpinolene	0.0321	0.0440	0.0756	20.3021	6.7495
Methyl salicylate	0.0069	0.0007	0.0021	1.6056	0.8892
( <i>Z</i> )-Jasmone	0.0125	0.0015	0.0039	1.7245	0.8856
Longifolene	0.0144	0.0022	0.0067	2.2750	1.3270
( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllene	0.7435	0.1280	0.3083	2.5473	1.1886



**Fig. 3** Relative gene expression analysis in tomato 7 d following a compatible aphid infestation. The graph displays the relative quantity (RQ) for each target gene, shown on a linear scale relative to the calibrator uninfested M82 (open columns) and 7 d after aphid attack (closed columns). Asterisks indicate that the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  values were significantly different from the calibrator ( $P < 0.01$ ; Student's  $t$ -test).

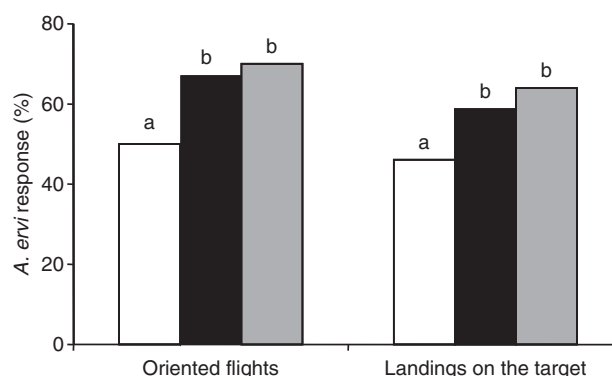


**Fig. 4** Relative expression level of genes involved in response to aphids in tomato aphid-susceptible (M82) and aphid-resistant (AN5 and AN7) genotypes. The graph displays the relative quantity (RQ), shown on a linear scale relative to the calibrator M82, of each target in M82 (white columns), AN5 (grey columns) and AN7 (black columns). Asterisks indicate that the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  values were significantly different from the calibrator ( $P < 0.01$ ; Student's  $t$ -test).

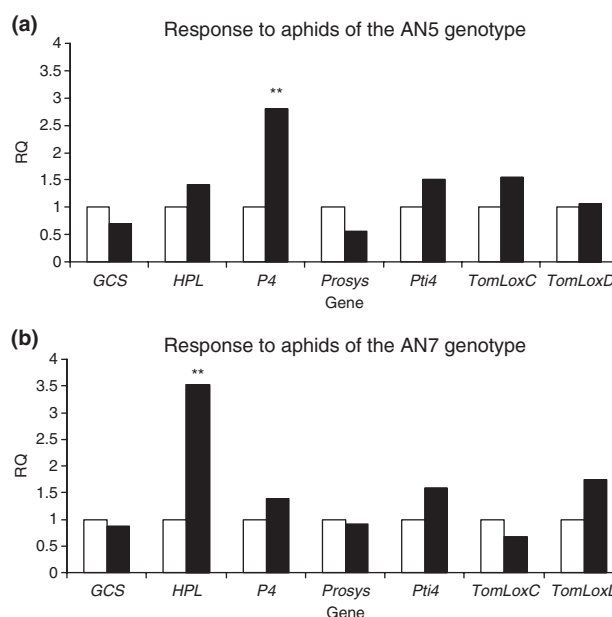
Fig. 4, both AN5 and AN7 express at significantly higher levels the four genes induced by aphid feeding: *HPL*, *TomLoxC*, *GCS* and *P4*.

### Induced plant response to aphid feeding

Following aphid infestation, the attractiveness of AN7 and M82 increased significantly, and reached a level similar to that of the uninfested AN5 plants, which, by contrast, did not show any enhancement of their attractiveness (compare Figs 2, 5) ( $G$  test showed that uninfested AN5 and all infested genotypes formed a homogeneous group:  $P = 1.1$ , not shown). Similar patterns of response were observed by analysing the percentages of landings on the target (Fig. 5):



**Fig. 5** Percentage of response (oriented flights, landings on the target) of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* towards the tomato genotypes (M82, white columns; AN5, black columns; AN7, grey columns) after aphid infestation. Different letters within each response indicate a significant difference ( $P < 0.01$ ).



**Fig. 6** Relative gene expression analysis 7 d following aphid infestation of the tomato aphid-resistant genotypes (a, AN5; b, AN7). The graph displays the relative quantity (RQ) for each target gene, shown on a linear scale relative to the uninfested calibrator (open columns) and 7 d after aphid attack (closed columns). Asterisks indicate that the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  values were significantly different from the calibrator ( $P < 0.01$ ; Student's  $t$ -test).

the percentage with respect to oriented flights remained consistently high in all three genotypes examined (91.9% in M82, 87.2% in AN5 and 92.6% in AN7).

We also monitored the variation in gene expression level in the two resistant genotypes, 7 d following infestation (Fig. 6). The results indicated that only one gene in each genotype (*P4* for the AN5 genotype and *HPL* for the AN7 genotype) was expressed at a higher level relative to uninfested plants. Interestingly, the induced higher expression of



HPL in AN7 was found to be consistent with the observed enhanced attractiveness.

## Discussion

The biodiversity of local germplasm accessions provides an interesting reservoir of plant material, which may show natural defences against biotic stress agents, associated with high-quality standards. Tomato plants have developed an efficient surveillance system that allows rapid reactions against biotic stress, which complement efficient constitutive defences, such as glandular trichomes, acyl sugar and toxic phenolic compounds. It has been demonstrated that R proteins detect, directly or indirectly, the presence not only of pathogens, but also of pest effectors, as in the case of the *Mi 1.2* gene (Rossi *et al.*, 1998). In addition to these gene-for-gene interactions, exerting a strong selection pressure on the natural populations of pest insects, tomato plants can mount an effective response by activating metabolic pathways that modulate multifactorial resistance mechanisms, targeting herbivores both directly and indirectly. We have identified two tomato genotypes, which lack the *Mi 1.2* gene, with a significantly high level of direct resistance against *M. euphorbiae*, coupled with attractiveness towards aphid parasitoids. The molecular fingerprint indicated that these genotypes were genetically different and, correspondingly, their performances were also different. For the AN5 genotype, only a few *M. euphorbiae* reached the adult stage and none reproduced. The resulting negative value of  $r_m$  indicates a very high level of resistance, which would certainly prevent a colonizing population of aphids from becoming established on this plant material. In the case of AN7, the  $r_m$  value was just above zero, indicating that this genotype does not allow diffuse aphid colonization. For both germplasm accessions, direct resistance was associated with an enhanced constitutive attractiveness towards the parasitoid *A. ervi*. The attractiveness of AN5 in the absence of aphid infestation was high and comparable with that recorded for the same parasitoid in response to broad bean plants infested by *Acyrtosiphon pisum* (Guerrieri *et al.*, 1993; Du *et al.*, 1996), or to tomato plants infested by *M. euphorbiae* (Sasso *et al.*, 2007). VOC analysis indicated the existence of a positive correlation between the amount of volatiles released and attractiveness towards parasitoids, which could be reinforced by the different relative ratios of specific compounds shared by the considered genotypes.

A thorough analysis of the absolute and relative releases of the identified compounds from the three uninfested genotypes, characterized by different degrees of attractiveness towards *A. ervi* females, allowed additional light to be shed on the mechanisms regulating the interactions between this generalist wasp and plants. The high attractiveness towards uninfested AN5 plants is associated with a high constitutive level of different compounds, with at least three

((*Z*)-jasmone, methyl salicylate and (*E*)- $\beta$ -caryophyllene) showing upregulation in tomato plants attacked by aphids (Sasso *et al.*, 2007), and eliciting positive electrophysiological responses, even at very low doses (Sasso *et al.*, 2009; E. Guerrieri & C. M. Woodcock, unpublished). However, this change is associated with very high levels of limonene (175 times higher than in M82, and representing 81% and 43% of the total volatiles released by AN5 and AN7, respectively), which has no direct effect on the modulation of *A. ervi* flight behaviour and its electrophysiological response (Sasso *et al.*, 2009). We may reasonably speculate that limonene may play a role, in combination with other compounds, by enhancing the overall detectability of the blend in which it is present in specific relative amounts. The biological importance of the ratio among compounds in the studied experimental system is also corroborated by the attraction of *A. ervi* towards the AN7 genotype, which shares with AN5 only some of the volatiles more significantly released by the latter, with the relative proportions of all the others being markedly different. It is also worth noting that the three main aphid-induced compounds mentioned above, involved in *A. ervi* attractiveness, are extremely common in the volatile blends of different plant species. This further reinforces the important role of the relative ratios in the elicitation of specific biological responses, even though a complex mixture of compounds, including the major components of volatile blends in equal concentrations, proved to be attractive for a large number of parasitoids (James, 2005; James & Grasswitz, 2005).

The importance of the ratio among different compounds in a complex blend is certainly one of the major parameters controlling insect-plant interactions (de Bruyne & Baker, 2008). In phytophagous insects, this parameter strongly influences the selection of plants on which insects feed (Visser, 1986; Fraser *et al.*, 2003), even though some groups can exploit very specific chemical cues, uniquely associated with a given group of plants (e.g. isothiocyanates for cruciferous plants) (Blight *et al.*, 1995).

There could be an apparent ecological contradiction associated to the concurrent presence of high levels of direct and indirect defences. Plants, as sessile organisms, must protect themselves against biotic stress agents occurring in the environment with powerful weapons, which very often are synthesized 'on demand' by activating specific metabolic pathways (Gatehouse, 2002; Howe & Jander, 2008). A number of inducible defence responses in plants occur with profound metabolic changes, some of which are not always involved in the direct defence reaction, but can be profitably exploited by natural antagonists of plant feeders/pathogens. Therefore, the selective advantage for the plant of getting rid of insect pests can lead to a selection process which stabilizes genetic traits controlling the indirect defences mediated by carnivores, and promotes an active 'cry for help' strategy (Dicke, 2009). However, a series of adaptive plant responses

seems to be more passive in an evolutionary sense (i.e. exploitation by natural enemies of metabolic changes not related to protection), and the proposed adaptiveness of 'crying for help' has been challenged in some cases (Van der Meijden & Klinkhamer, 2000; Gatehouse, 2002). These scenarios are not mutually exclusive and could coexist in the same evolutionary context in response to multiple challenges, promoting the development of plant defence traits that contribute significantly to the structure of natural insect communities (Poelman *et al.*, 2008). The experimental data presented here provide an interesting opportunity to analyse this microevolutionary pathway. Aphid fitness is at the lowest on the tomato genotypes considered. The associated higher attractiveness towards aphid parasitoids seems to be a consequence of the increased constitutive expression of aphid-inducible genes, which regulate both direct and indirect resistance. Although the benefit of aphid suppression is obvious, it is more difficult to determine, at this stage, the benefit associated with the higher attractiveness of parasitoids towards poor or very low host populations on fairly resistant plants. In other words, the attraction of parasitoids by uninfested plants can be viewed as a kind of collateral product of a selection process in favour of effective direct defences, and the absence of host aphids on these attractive plants is expected to enhance the rapid dispersal of parasitoids. This hypothesis needs to be tested under field conditions in order to assess the relative contributions of direct and indirect defences to the overall resistance of the tomato genotypes considered here. These accessions offer new tools to analyse the dynamics of the microevolutionary processes driving the selection of alleles conferring plant resistance against insects.

Nonetheless, some of the volatiles emitted at higher rates by AN5 and AN7 may also have some direct effects on aphids. The possible direct defensive role of (*E*)- $\beta$ -caryophyllene remains to be assessed, whereas it has been reported previously for both methyl salicylate and (*Z*)-jasmone. For example, barley plants exposed to methyl salicylate were less well accepted and less well colonized by the aphid *Rhopalosiphum padi* (Glinwood *et al.*, 2007). Similarly, (*Z*)-jasmone has been demonstrated to be repellent for the aphid *Nasonovia ribis-nigri* (Birkett *et al.*, 2000; Bruce *et al.*, 2008). Conversely, (*E*)- $\beta$ -caryophyllene has been more often related to indirect defence only, above ground and below ground, against different pests in different crops (Colazza *et al.*, 2004; Rassman *et al.*, 2005). Therefore, we hypothesize that some of the volatile compounds identified may play a double role. Studies addressing this issue in the experimental system used are certainly worthy of further research efforts. We are currently assessing the possible role in direct defence against aphids of the other volatile compounds released at a higher rate by the two accessions considered. This will shed light on the biological role of these chemicals, and may provide new tools for aphid control.

The bioassays performed with plant material indicated that, in the tomato genotypes used, the resistance traits are expressed mainly (AN7), if not entirely (AN5), in a constitutive manner. As plant resistance to biotic stress also includes the activation of gene expression, we wanted to test whether aphid responsive genes were constitutively expressed at higher levels in the aphid-resistant genotypes. For this purpose, we first studied plant response after a prolonged aphid attack, by analysing gene expression after 7 d of infestation. Key genes were selected, considering their role in the signalling pathways that, in tomato, are elicited by phytophagous pests. Selected genes belong to the JA and SA pathways and are also involved in the production of bioactive VOCs. As expected, the data indicated that the tomato response to aphids involves different signalling pathways. For instance, it has been shown that tomato lipoxygenases are involved in plant-induced defences towards pests through the production of toxic and anti-feedant compounds (Fidantsef *et al.*, 1999). The gene expression analysis performed indicated that, among the tomato Lox isoforms that are targeted to chloroplasts, only TomLoxC is involved in aphid response. This is consistent with the previous evidence which indicated that *TomLoxC*, as a member of the lipoxygenase gene family, is involved in the response against herbivores (Corrado *et al.*, 2007). More interestingly, the results indicated that, among the genes analysed, overexpression in the resistant genotypes was observed only for genes activated by aphid infestation. Considering that, of the resistant genotypes, AN5 showed a constitutively higher level of expression for *HPL*, *GCS* and *TomLoxC*, it is tempting to speculate that the higher resistance level of this genotype is correlated with these quantitative differences. However, the higher expression of *HPL* in AN7, induced by aphid feeding, is associated with an enhancement of attractiveness, which attains a level similar to that constitutively observed for AN5 (Figs 2, 5).

The results strongly suggest that the resistance observed in the landraces AN5 and AN7, although most probably multifactorial, is related to a constitutively higher level of expression of defence genes that respond to aphid attack. In other plant species, genes described as upregulated in aphid-resistant genotypes are involved in different physiological processes. They include vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase subunit-like proteins in apple, and cytochrome P450 monooxygenase genes, chlorophyll *a/b*-binding protein genes and cellulose synthase genes in sorghum and wheat (Qubbaj *et al.*, 2005; Boyko *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006). It is worth noting that the different biological performances shown by the resistant and susceptible genotypes analysed are associated with the overexpression of genes whose activity is clearly linked to direct and indirect resistance against pests. However, it will be interesting to perform a comprehensive transcriptomic analysis to outline a complete picture of

tomato response to aphid infestation. Moreover, it will also be of considerable interest to assess the variability of aphid and parasitoid response to the phenotypic traits controlled by these genes, which is likely to occur in different strains, as reported for the *Mi* gene (Goggin *et al.*, 2001).

Apparently, the higher cost associated with plant constitutive defences does not seem to be relevant for AN5 (Zangerl, 2003). Indeed, the resistance traits of the 'best performer' AN5 do not influence yield and fruit quality significantly, which are comparable or better than those of other local landraces and commercial hybrids (Giordano *et al.*, 2000; Andreakis *et al.*, 2004).

In conclusion, this study has identified aphid-resistant genotypes in cultivated tomato and candidate genes whose expression is associated with aphid resistance. Moreover, the tomato genotypes considered can provide new opportunities for studying the microevolutionary pathways that shape plant resistance. Although further studies are necessary to unravel the complexity of the genetic basis of the observed traits, our results corroborate the hypothesis that traditional germplasm, which has been subjected to very little breeding, may represent an important source of material amenable to low-input farming and/or organic agriculture. Our data also suggest that the modulation and exploitation of endogenous plant defence could be a valid strategy to improve tomato resistance against aphids, hopefully overcoming some limitations of the single gene resistance approach (Singh & Singh, 2005).

## Acknowledgements

This research was supported by Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca – Laboratorio Pubblico-Privato di Genomica per l'innovazione e la valorizzazione della filiera del pomodoro (GenoPOM), DM17732.

## References

- Adams P. 2001. *Identification of essential oil components by gas chromatography: quadrupole mass spectroscopy*. Carol Stream, IL, USA: Allured Publications.
- Agrawal AA, Tuzun S, Bent E. 1999. *Induced plant defenses against pathogens and herbivores. Biochemistry, ecology, and agriculture*. St Paul, MN, USA: APS Press.
- Andreakis N, Giordano I, Pentangelo A, Fogliano V, Graziani G, Monti LM, Rao R. 2004. DNA fingerprinting and quality traits of Corbarino cherry-like tomato landraces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3366–3371.
- Birch LC. 1948. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *Journal of Animal Ecology* 17: 15–26.
- Birkett MA, Campbell CAM, Chamberlain K, Guerrieri E, Hick AJ, Martin JL, Matthes M, Napier JA, Pettersson J, Pickett JA *et al.* 2000. New roles for *cis*-jasmonate as an insect semiochemical and in plant defence. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 9329–9334.
- Blight MM, Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock C. 1995. Antennal perception of oilseed rape, *Brassica napus* (Brassicaceae), volatiles by the cabbage seed weevil *Ceutorhynchus assimilis* (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Chemical Ecology* 21: 1649–1664.
- Boyko EV, Smith CM, Thara VK, Bruno JM, Deng YP, Starkey SR, Klaassen DL. 2006. Molecular basis of plant gene expression during aphid invasion: wheat Pto- and Pti-likeA sequences are involved in interactions between wheat and Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 99: 1430–1445.
- Bruce TJ, Matthes MC, Chamberlain K, Woodcock CM, Mohib A, Webster B, Smart LE, Birkett MA, Pickett JA, Napier JA. 2008. *cis*-Jasmone induces *Arabidopsis* genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 105: 4553–4558.
- de Bruyne M, Baker TC. 2008. Odor detection in insects: volatile codes. *Journal of Chemical Ecology* 34: 882–897.
- Caramante M, Rao R, Monti LM, Corrado G. 2009. Discrimination of 'San Marzano' accessions: a comparison of minisatellite, CAPS and SSR markers in relation to morphological traits. *Scientia Horticulturae* 120: 560–564.
- Casteel C, Walling LL, Paine T. 2006. Behavior and biology of the tomato psyllid, *Bactericera cockerelli*, in response to the *Mi-1.2* gene. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 121: 67–72.
- Chakravarthy S, Tuori RP, D'Ascenzo MD, Fobert PR, Despres C, Martin GB. 2003. The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box *cis* elements. *Plant Cell* 15: 3033–3050.
- Colazza S, McElfresh JS, Millar JG. 2004. Identification of volatile synomones, induced by *Nezara viridula* feeding and oviposition on bean spp., that attract the egg parasitoid *Trissolcus basalus*. *Journal of Chemical Ecology* 30: 945–964.
- Corrado G, Arciello S, Fanti P, Fiandra L, Garonna A, Digilio MC, Lorito M, Giordano B, Pennacchio F, Rao R. 2008. The Chitinase A from the baculovirus AcMNPV enhances resistance to both fungi and herbivorous pests in tobacco. *Transgenic Research* 17: 557–571.
- Corrado G, Delli Bovi P, Ciliento R, Gaudio L, Di Maro A, Aceto S, Lorito M, Rao R. 2005. Inducible expression of a *Phytolacca heterotepala* ribosome-inactivating protein leads to enhanced resistance against major fungal pathogens in tobacco. *Phytopathology* 95: 206–215.
- Corrado G, Sasso R, Pasquariello M, Iodice L, Carretta A, Cascone P, Ariati L, Digilio MC, Guerrieri E, Rao R. 2007. Systemin regulates both systemic and volatile signalling in tomato plants. *Journal of Chemical Ecology* 33: 669–681.
- Dicke M. 2009. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant, Cell & Environment* 32: 654–665.
- Du YJ, Poppy GM, Powell W. 1996. Relative importance of semiochemicals from first and second trophic level in host foraging behaviour of *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology* 22: 1591–1606.
- Fazio G, Stevens MR, Scott JW. 1999. Identification of RAPD markers linked to fusarium crown and root rot resistance (Frl) in tomato. *Euphytica* 105: 205–210.
- Fidantsef AL, Stout MJ, Thaler JS, Duffey SS. 1999. Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54: 97–114.
- Fraser AM, Mechaber WL, Hildebrand JG. 2003. Electroantennographic and behavioral responses of the sphinx moth *Manduca sexta* to host plant headspace volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 29: 1813–1833.
- Gatehouse JA. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist* 156: 145–169.
- Giordano I, Pentangelo A, Villari G, Fasanaro G, Castaldo D. 2000. Caratteristiche agronomiche e idoneità alla trasformazione di pomodori



- dell'ecotipo "Corbarino". *Industria Conserve* 75: 317–329. (In Italian with English abstract).
- Girling RD, Madison R, Hassall M, Poppy GM, Turner JG. 2008. Investigations into plant biochemical wound-response pathways involved in the production of aphid-induced plant volatiles. *Journal of Experimental Botany* 59: 3077–3085.
- Glinwood R, Gradin T, Karpinska B, Ahmed E, Jonsson L, Ninkovic V. 2007. Aphid acceptance of barley exposed to volatile phytochemicals differs between plants exposed in daylight and darkness. *Plant Signalling & Behavior* 2: 321–326.
- Goggin FL, Williamson VM, Ullman DE. 2001. Variability in the response of *Macrosiphum euphorbiae* and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) to the tomato resistance gene *Mi*. *Environmental Entomology* 30: 101–106.
- Guerrieri E, Digilio MC. 2008. Aphid–plant interactions: a review. *Journal of Plant Interactions* 3: 223–232.
- Guerrieri E, Pennacchio F, Tremblay E. 1993. Flight behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) in response to plant and host volatiles. *European Journal of Entomology* 90: 415–421.
- Guerrieri E, Poppy GM, Powell W, Rao R, Pennacchio F. 2002. Plant to plant communication mediating in-flight orientation of *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology* 28: 1703–1715.
- Hebert SL, Jia L, Goggin FL. 2007. Quantitative differences in aphid virulence and foliar symptom development on tomato plants carrying the *Mi* resistance gene. *Environmental Entomology* 36: 458–467.
- Howe GA, Jander G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59: 41–66.
- James DG. 2005. Further field evaluation of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. *Journal of Chemical Ecology* 31: 481–495.
- James DG, Grasswitz TR. 2005. Synthetic herbivore-induced plant volatiles increase field captures of parasitic wasps. *BioControl* 50: 871–880.
- Kaloshian I, Kinsey MG, Ullman DE, Williamson VM. 1997. The impact of *Meu-1*-mediated resistance in tomato on longevity, fecundity and behavior of the potato aphid *Macrosiphum euphorbiae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83: 181–187.
- Kennedy GG. 2003. Tomato, pests, parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. *Annual Review of Entomology* 48: 51–72.
- Lange WH, Bronson L. 1981. Insect pests of tomato. *Annual Review of Entomology* 26: 345–371.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)–(Delta Delta C) method. *Methods* 25: 402–408.
- Martin GB, Williams JGK, Tanksley SD. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 88: 2336–2340.
- Mysore KS, D'Ascenzo MD, He XH, Martin GB. 2003. Overexpression of the disease resistance gene *Pto* in tomato induces gene expression changes similar to immune responses in human and fruitfly. *Plant Physiology* 132: 1901–1912.
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56: 2907–2914.
- Nombela G, Williamson VM, Muniz M. 2003. The root-knot nematode resistance gene *Mi-1.2* of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Molecular Plant–Microbe Interaction* 16: 645–649.
- Park SJ, Huang YH, Ayoubi P. 2006. Identification of expression profiles of sorghum genes in response to greenbug phloem-feeding using cDNA subtraction and microarray analysis. *Planta* 223: 932–947.
- Poelman EH, van Loon JJA, Dicke M. 2008. Consequences of variation in plant defense for biodiversity at higher trophic levels. *Trends in Plant Science* 13: 534–541.
- Qubaj T, Reineke A, Zebitz CPW. 2005. Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its primary host *Malus domestica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115: 145–152.
- Rao R, Corrado G, Bianchi M, Di Mauro A. 2006. (GATA)(4) DNA fingerprinting identifies morphologically characterized 'San Marzano' tomato plants. *Plant Breeding* 125: 173–176.
- Rassman S, Köllner TG, Degenhard J, Hiltbold I, Toepfer S, Kuhlmann U, Gershenzon J, Turlings TCJ. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* 434: 732–737.
- Rohlf FJ, Sokal RR. 1995. *Statistical tables*, 3rd edn. New York, NY, USA: WH Freeman and Co.
- Rossi M, Goggin FL, Milligan SB, Kaloshian I, Ullman DE, Williamson VM. 1998. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95: 9750–9754.
- Ruiz JJ, Garcia-Martinez S, Pico B, Gao MQ, Quiros CF. 2005. Genetic variability and relationship of closely related Spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130: 88–94.
- Sasso R, Iodice L, Digilio MC, Carretta A, Ariati L, Guerrieri E. 2007. Host-locating response by the aphid parasitoid *Aphidius ervi* to tomato plant volatiles. *Journal of Plant Interactions* 2: 175–183.
- Sasso R, Iodice L, Pickett JA, Woodcock CM, Guerrieri E. 2009. Behavioural and electrophysiological responses of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) to tomato plant volatiles. *Chemoecology* 19: 195–201.
- Singh DP, Singh A. 2005. *Disease and insect resistance in plants*. Enfield, NH, USA: Science Publisher.
- Smith CM, Boyko EV. 2007. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 122: 1–16.
- Sobir TO, Ohmori T, Murata M, Motoyoshi F. 2000. Molecular characterization of the SCAR markers tightly linked to the Tm-2 locus of the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 64–69.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1981. *Biometry*, 2nd edn. New York, NY, USA: WH Freeman and Co.
- Thompson GA, Goggin FL. 2006. Transcriptomics and functional genomics of plant defence induced by phloem-feeding insects. *Journal of Experimental Botany* 57: 747–754.
- Van der Meijden E, Klinkhamer PGI. 2000. Conflicting interests of plants and the natural enemies of herbivores. *Oikos* 89: 202–208.
- Vancanneyt G, Sanz C, Farmaki T, Paneque M, Ortego F, Castañera P, Sanchez-Serrano JJ. 2001. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 8139–8144.
- Visser JH. 1986. Host odour perception in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology* 31: 121–144.
- Vos P, Simons G, Jesse T, Wijnbrandi J, Heinen L, Hogers R, Frijters A, Groeendijk J, Diergaarde P, Reijns M *et al.* 1998. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nature Biotechnology* 16: 1365–1369.
- Vosman B, Arens P, Ruskortekaas W, Smulders MJM. 1992. Identification of highly polymorphic DNA regions in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 239–244.
- Wäckers FL, Bonifay C. 2004. How to be sweet? Extrafloral nectar allocation by *Gossypium hirsutum* fits optimal defense theory predictions. *Ecology* 85: 1512–1518.



- Walgenbrach JF. 1997. Effect of potato aphid (Homoptera: Aphididae) on yield, quality, and economics of staked-tomato production. *Journal of Economic Entomology* **90**: 996–1004.
- Williamson VM, Ho JY, Wu FF, Miller N, Kaloshian I. 1994. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi, in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* **87**: 757–763.
- Zangerl AR. 2003. Evolution of induced plant responses to herbivores. *Basic and Applied Ecology* **4**: 91–103.

## Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

**Table S1** Primers for cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) analysis and size of the expected restriction fragments (R, resistance allele; S, susceptible allele).

**Table S2** Primers employed for the expression study and their main features.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

## Study of molecular bases of plant-aphid interaction

V. COPPOLA

### Phloem-feeding insects, octadecanoid pathway, salicylic acid pathway, *Mi* gene

*Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, School of Biotechnology, University of Naples "Federico II, Portici (NA), Italy*

Insect pests cost billions of dollars in the form of crop losses and insecticides, and farmers face an ever-present threat of insecticide resistance, fueling a continual search for alternative pest-control strategies. For environmental and economic reasons there is a demand for resistant varieties to reduce the use of pesticides to combat insect pests. The study of plant defence mechanism offers interesting information about novel genes suitable to control agricultural pests, as some of these genes play a key role in reducing phytophagous performance. It's known that plants have multiple mechanisms to defend themselves against herbivores attacks, but the molecular mechanism underlying these responses remains unclear.

These defence responses can be described as constitutive or induced. A constitutive defense can act as a physical barrier, a biochemical signal perceived by the herbivore or as a toxin. Induced mechanisms leads to the synthesis of many chemicals in response to insect attack, among them there are the so-called secondary metabolites that increase plant resistance to herbivores in direct and indirect way. The direct defence is based, for instance, through the production of compounds that inhibit herbivore feeding and digestion or have toxic activity. Plants, moreover, can defend themselves in indirect way, by producing volatile compounds that attract carnivore enemies of herbivore. However the development of

an appropriate defence requires that plants recognize pests as early as possible. Consequently, plant responses are correlated to the mode of insect feeding and the degree of tissue damage at the feeding site. Phloem-feeding insects, such as aphids, are serious pests that cause extensive crop damage. The diversity and abundance of phloem-feeding insects stand in contrast with the limited amount of information available about molecular and physiological plant responses and resistance mechanisms against these herbivores, indeed little is known about how plants perceive these arthropods and activate endogenous defences.

Aphids are highly specialized in their mode of feeding and impose a complex stress on plants. Differently from herbivorous pests, most aphids and other phytophagous homopterans feed from plant vascular tissue by inserting a stylet into conductive cells. By inserting the stylet between cells, rather than puncturing them, this process can minimize cell damage, and thus avoid induction of a wounding response. Consequently plant respond to aphids activating various processes. Smith and Boyko (2007)<sup>1</sup> suggest that aphid feeding may trigger multiple signaling pathways in plants that include a gene-for-gene recognition of aphid-derived elicitors

by plant resistance genes and an activation of pathogen- and wound-induced pathways. A remarkable background of basic information has been produced on tomato-pest-natural enemy interactions, that is unique for crop plants<sup>2</sup>. Mechanisms of direct resistance to aphids in tomato plants have been extensively investigated. Indeed, the most studied gene of resistance to animal pests is *Mi 1.2*, isolated from *Solanum habrochaites*, which confers resistance to the aphid *M. euphorbiae* and to three species of nematodes. The *Mi* mechanism is a typical gene-for-gene interaction, mediated by recognition processes of aphid derived elicitors by plant resistance effectors.

In recent years, changes in gene expression induced by aphid attack have been studied using transcriptional profiling in a number of plant/aphid interactions. These studies have revealed that many of the induced genes are coding for proteins potentially involved in defence, like pathogenesis-related proteins or protein inhibitors, but effects on genes involved in cell wall fortification, oxidative stress, primary and secondary metabolism and photosynthesis have also been recorded. Moran and Thompson<sup>3</sup> demonstrates, through microarray analysis, induction of components of multiple plant response pathways by green peach aphids (*Myzus persicae*) feeding on leaves of *Arabidopsis*. The expression of *PR* genes, jasmonate responsive genes, and more broadly sensitive genes increased to varying degrees in response to infestation. More recently, Qubbaj *et al.*<sup>4</sup> utilized cDNA-AFLP method to investigate the transcriptional response of resistant and susceptible cultivars of apple to infestation with the rosy apple aphid, *D. plantaginea*. Identified genes revealed homologies to genes related to plant stress defence, suggesting that they might also play an important role in resistance mechanisms against aphids and that the resistance of apple trees against aphids is regulated by similar signal transduction mechanisms to those previously described in plants as a response to different abiotic or biotic stressors.

In a current study was analyzed the transcriptional changes of some defensive genes in two landraces, AN5 and AN7, that were collected in Campania. These landraces have high levels of direct

and indirect resistance to *Macrosiphum euphorbiae* in comparison to the control tomato cultivar M82. A CAPS analysis of four resistance genes to biotic stress (including REX1, associated with *Mi* that confers resistance against the potato aphid, *M. euphorbiae*) did not show differences, being all the genotypes susceptible. The expression analysis of genes involved in different biotic stress-response, such as those involved in the synthesis of PR proteins (P4 and Pti4), direct and indirect defense against herbivores (*TomLoxC*, *TomLoxD*, *HPL* and *GCS*) and jasmonate biosynthesis (*prosystemin*), in absence and after controlled infestations with *M. euphorbiae*, indicated that the plant response to aphids involves different metabolic pathways, as expected. More interestingly, the results showed that the constitutive over-expression of genes that respond to aphid associates with higher level of direct and indirect defense in tomato. Differences after infestations between resistant and susceptible genotypes were limited. The results suggest that the resistance observed in the landraces AN5 and AN7, should be related to constitutive higher level of expression of defensive genes<sup>5</sup>. Therefore plant defense response to aphid are complex and multifactorial. Plant genomics provides powerful tools to study these interactions, implying that the modulation and the exploitation of knowledges about endogenous plant defence should be a practicable strategy to improve plant resistance against aphids.

## References

1. Smith CM, Boyko EV. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2006, 122:1-16.
2. Kennedy GG. Tomato, pests, parasitoids, and predators: Tri-trophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. *Annual Review of Entomology* 2003, 48:51-72.
3. Moran PJ, Thompson GA. Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiology* 2001, 125: 1074-1085.
4. Qubbaj T, Reineke A, Zebitz CPW. Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its primary host *Malus domestica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2005, 115, 145-152.
5. Digilio MC, Corrado G, Sasso R, Coppola V, Iodice L, Pasquariello M, Bossi S, Maffei ME, Coppola M, Pennacchio F, Rao R, Guerrieri E. Molecular and chemical mechanisms involved in aphid resistance in cultivated tomato. *New Phytologist* 2010, accepted.

## CAMBIAMENTI TRASCRIZIONALI DI GENI DI DIFESA IN RISPOSTA AD AFIDI IN GENOTIPI DI POMODORO SUSCETTIBILI E RESISTENTI

V. Coppola<sup>1</sup>, G. Corrado<sup>1</sup>, M.C. Digilio<sup>2</sup>, M. Pasquariello<sup>1</sup> & R. Rao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, Facoltà di Biotecnologie, Università di Napoli "Federico II", Portici

<sup>2</sup>Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria "Filippo Silvestri", Università di Napoli "Federico II", Portici

La diversità e l'abbondanza degli insetti che si nutrono di floema, tra cui gli afidi, è in contrasto con la limitata quantità d'informazioni disponibili circa le risposte molecolari e fisiologiche della pianta e i meccanismi di resistenza attivati contro questi insetti erbivori. Gli afidi sono insetti altamente specializzati nel loro meccanismo di alimentazione e causano un complesso stress alla pianta. Diversamente dagli insetti erbivori, infatti, la prolungata interazione che essi stabiliscono con i tessuti delle piante, tramite il loro stilettto, minimizza i danni meccanici, con conseguente attivazione di diversi processi di difesa della pianta.

In questo lavoro abbiamo analizzato i cambiamenti trascrizionali di diversi geni di difesa in genotipi di pomodoro suscettibili o resistenti ad afidi. Il materiale analizzato include due ecotipi campani, AN5 e AN7, che hanno elevati livelli di resistenza diretta e indiretta a *Macrosiphum euphorbiae*, e la cultivar controllo M82, suscettibile agli afidi. Tale cultivar, come dimostrato da una analisi CAPS, non possiede comuni geni di resistenza a stress biotici, così come gli ecotipi campani. L'analisi di espressione dei geni coinvolti nelle risposte di difesa diretta e indiretta contro gli insetti è stata effettuata tramite analisi Real-Time PCR in assenza e dopo infestazione controllate con l'afide *M. euphorbiae*. I geni analizzati sono stati quelli appartenenti a differenti risposte di difesa, come quelli coinvolti nella sintesi delle proteine PR (P4 e Pti4), nelle risposte di difesa dirette e indirette contro erbivori (*TomLoxC*, *TomLoxD*, *HPL* e *GCS*).

I risultati indicano che le risposte della pianta agli afidi coinvolgono differenti pathway metabolici, come atteso. Inoltre, è interessante che i geni che sono costitutivamente sovraespressi negli ecotipi resistenti ad afidi siano anche quelli coinvolti nella risposta a questi insetti fitomizi. I risultati suggeriscono che la resistenza osservata negli ecotipi AN5 e AN7, sebbene probabilmente complessa e multifattoriale, è associata ad un livello più alto di espressione di geni di risposta ad afidi. Ciò implica che lo studio e l'utilizzo delle difese endogene della pianta potrebbero essere alla base delle nuove strategie atte a migliorare la resistenza del pomodoro contro afidi.

Parole chiave: interazione pianta-insetto, octadecanoidi, acido salicilico

## STUDY OF MOLECULAR BASES OF PLANT-APHID INTERACTION

COPPOLA V.\*, CORRADO G.\*, BUONOMO T.\*\*, DIGILIO M.C.\*\*\*, RENZONE G.\*\*\*\*,  
D'AMBROSIO C.\*\*\*\*, SCALONI A.\*\*\*\*, ROCCO M.\*\*\*\*\*, MARTINELLI R.\*\*, RAO R.\*

\*) Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, School of Biotechnology, University of Naples “Federico II”, Via Università 100, 80055 Portici (Italy)

\*\*) CEINGE - Biotecnologie Avanzate s.c. a r.l., Via Comunale Margherita 482, 80145 Naples (Italy)

\*\*\*) Department of Entomology and Zoology, University of Naples “Federico II”, Via Università 100, 80055 Portici (Italy)

\*\*\*\*) ISPAAM, National Research Council, Via Argine 1085, 80147 Napoli (Italy)

\*\*\*\*\*) Department of Biological and Environmental Sciences, University of Sannio, Via Port Arsa 11, 82100 Benevento (Italy)

### *Plant–insect interaction, phloem-feeding insects, microarray, gene expression*

The development of an appropriate defence requires that plants recognize pests as early as possible. Consequently, plant responses are correlated to the mode of insect feeding and the degree of tissue damage at the feeding site. Although phloem-feeding pests, including aphids, cause extensive crop damage, only few data are available about how plants perceive these arthropods and activate endogenous defences.

Aphids are highly specialized in their mode of feeding and impose a complex stress on plants. Differently from herbivorous pests, the prolonged interaction of aphid stylets and plant tissue causes minimal mechanical damage and consequently, plants respond to aphids activating various defense mechanisms.

The potato aphid (*Macrosiphum euphorbiae* T.) is an important pest of tomato and other Solanaceae. Besides vectoring pathogenic viruses, this species causes physical damage to green tissues and removal of photoassimilates, which result in high yield loss when populations are high. Tomato (*Solanum lycopersicum*) transcriptional changes in response to aphids and molecular mechanisms associated with the development of symptoms are currently largely unexplored. To investigate tomato responses activated during a compatible interaction, we used a microarray analysis to monitor changes in host gene expression during *M. euphorbiae* attack.

We present a time series-based investigation of the tomato cv Microtom after *M. euphorbiae* infestation. Transcriptomic changes were studied 24h, 48h and 96h after infestation to monitor the progress of early induced responses. Transcriptional reconfiguration covered a broad range of biological processes, which include both primary and secondary metabolism. We also carried out a proteomic study 48h following aphid attacks to identify differentially expressed protein compared to uninfested control plants. About 87 differential expressed spot were identified and 49 out of them represented a single protein. These sequences were classified by Blast2go database and most of them were involved in functions highlighted by the transcriptomic analysis, e.g. primary and secondary metabolism of the plant, photosynthesis, oxidative and defence stress response.

This study showed how plant aphid response are complex and multifactorial. Because the modulation of endogenous defense may be a practicable strategy to improve plant resistance against

aphids, integrating transcriptomics and proteomics can greatly contribute to a systems-level understanding of host response.

## STUDIO DELLE BASI MOLECOLARI DELL'INTERAZIONE PIANTA-AFIDE

V. Coppola<sup>1\*</sup>, G. Corrado<sup>1</sup>, T. Buonomo<sup>2</sup>, MC. Digilio<sup>3</sup>, G. Renzone<sup>4</sup>, C. D'Ambrosio<sup>4</sup>, A. Scaloni<sup>4</sup>, M. Rocco<sup>5</sup>, R. Martinelli<sup>2</sup>, R. Rao<sup>1</sup>

1 Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta dell'Ambiente delle Produzioni Animali, Portici, Università di Napoli Federico II

2 CEINGE - Biotecnologie Avanzate s.c.a r.l., Napoli

3 Dipartimento di Entomologia e Zoologia, Portici, Università di Napoli Federico II

4 ISPAAM, National Research Council, Napoli

5 Dipartimento di Scienze Biologiche e Ambientali, Benevento, Università del Sannio

La diversità e l'abbondanza degli insetti che si nutrono di floema, tra cui gli afidi, è in contrasto con la limitata quantità d'informazioni disponibili circa le risposte molecolari e fisiologiche della pianta e i meccanismi di resistenza attivati contro questi insetti erbivori. Gli afidi sono insetti altamente specializzati nel loro meccanismo di alimentazione e causano un complesso stress alla pianta. Diversamente dagli insetti erbivori, infatti, la prolungata interazione che essi stabiliscono con i tessuti della pianta, minimizza i danni meccanici, con conseguente attivazione di diversi processi di difesa. L'afide della patata (*Macrosiphum euphorbiae* T.) è uno dei parassiti più dannosi del pomodoro coltivato (*Solanum lycopersicum*), a cui causa danni diretti, come foglie deformi e avvizzimento, oltre a danni indiretti come la trasmissione di virus patogeni. In pomodoro i cambiamenti trascrizionali in risposta all'attacco dell'afide ed i meccanismi molecolari associati allo sviluppo del danno sono ancora largamente inesplorati. Per investigare quali siano le risposte attivate in seguito all'attacco dell'afide, è stata condotta un'analisi trascrittomico e proteomico nella varietà di pomodoro 'Microtom'. Per monitorare i cambiamenti nell'espressione genica è stata effettuata un'analisi microarray a 24h, 48h e 96h dall'attacco di *M. euphorbiae*. I cambiamenti trascrizionali hanno ricoperto un ampio numero di processi biologici, quali il metabolismo primario e secondario, la risposta a stress biotici e ossidativi, la fotosintesi. L'analisi proteomica, condotta dopo 48h ha individuato 87 spot differenzialmente espressi, 49 dei quali rappresentano una singola proteina. Queste sequenze sono state classificate tramite il database Blast2go e mostrano una buona correlazione con le funzioni rilevate dall'analisi trascrittomico. Questo studio ha mostrato che la risposta molecolare della pianta di pomodoro all'attacco afidico è complessa e multifattoriale e rappresenta un importante contributo per la successiva comprensione di specifici meccanismi di resistenza del pomodoro agli afidi.

Interazione pianta insetto, insetti fitomizi, microarray

Area tematica: 11

MC Digilio et al., New Phytologist

V Coppola, Minerva Medica

M Rocco et al., Journal of Proteomics

**Session 4: Insect Interactions**

Wednesday 9<sup>th</sup> November, 10:15-10:30

**A time series-based study of transcriptional changes of tomato plants induced by potato aphid (*M. euphorbiae*) attack**

**VALENTINA COPPOLA<sup>(1)</sup>, TONIA BUONOMO<sup>(2)</sup>, MARIA CRISTINA DIGILIO<sup>(3)</sup>, ROSANNA MARTINELLI<sup>(2)</sup>,  
GIANDOMENICO CORRADO<sup>(1)</sup> AND ROSA RAO<sup>(1)</sup>**

(1) Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, School of Biotechnology,  
University of Naples "Federico II", Portici (NA), ITALY

(2) CEINGE - Biotechnologie Avanzate s.c. a r.l., Naples, ITALY

(3) Department of Entomology and Zoology, University of Naples "Federico II", Portici (NA), ITALY  
valentina.coppola@unina.it

In recent years for the study of large-scale changes in gene expression induced by insect pest attacks novel techniques, as microarray technologies, have been used. Tomato (*Solanum lycopersicum*) transcriptomic responses to aphids are currently largely unexplored. The potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae* Thomas, is a key pest of tomato all over the world causing direct and indirect damage to plants.

In this study we performed a microarray analysis of gene expression 24h, 48h and 96h after *M. euphorbiae* infestation to identify differentially expressed genes compared to uninfested plants. The investigation of the overall transcriptome has highlighted a dynamic response of the plant to aphid attack with an extensive gene expression changes after 48h. In the first 24h following attack, plant triggered the up-regulation of several genes encoding receptor involved in early signalling perception and defence proteins of salicylic acid and ethylene pathways. Proteins involved in signals related to oxidative stress and calcium, as well as several WRKY transcription factors, were up-regulated from the 48h in tomato infested by *M. euphorbiae*. Besides, several anti-insect proteins, jasmonic acid-dependent, were specifically up or down regulated, showing how the response of the plant was highly specific. On the other hand aphid attack caused changes of the expression of genes involved in cell wall modification, water transport, vitamin biosynthesis, photosynthesis, carbon and nitrogen assimilation.

This study demonstrate an extensive reprogramming of transcription in plants following aphid attack by the induction of different classes of genes, giving greatly advanced about understanding of tomato defence mechanisms against aphids.